

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Magdalena Žánová

# STANDARDIZACE DYNAMICKÝCH TESTŮ HYPOKORTIKALISMU

Standardization of dynamic tests of hypocorticalism

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Ing. Drahomíra Springer, Ph.D.

Praha 2015

Tato diplomová práce vznikla ve spolupráci s Ústavem lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky VFN a 1. LF UK na Karlově náměstí v Praze v rámci řešení a za finanční podpory grantového projektu Standardizace diagnostických přístupů hypokortikalismu a je jeho součástí (NT 11 277 - 6, 2010 - 2015, GIGH – 1021 – 00 – 6 - 0203). Hlavními řešiteli tohoto projektu jsou MUDr. Kateřina Šimůnková, Ph.D, prof. MUDr. RNDr. Luboslav Stárka, DrSc. a MUDr. Michaela Dušková, Ph.D.

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze, je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 17. dubna 2015.

.....

# Abstrakt a klíčová slova

## Abstrakt

V rámci této práce – Standardizace dynamických testů hypokortikalismu - byly imunoanalyticky stanovovány hladiny hormonů používaných při diagnostice chorob kůry nadledvin. Součástí grantového projektu bylo i vyšetření kontrolní skupiny 66 zdravých osob ve věkovém rozmezí 19 – 68 let. U této skupiny, jež podstoupila inzulínový toleranční test (ITT), se potvrdilo, že dosažená hypoglykémie není závislá na věku. Na indexu tělesné hmotnosti (BMI) je hypoglykémie závislá jen částečně, a to u osob s BMI větším než 30. Hladiny slinného kortizolu během inzulínového testu vykazovaly u části kontrolní skupiny maximum v 90. minutě, zatímco u sérového kortizolu bylo maxima obvykle dosaženo v 60. minutě. Použití slin u tohoto zátěžového testu je jen velmi omezené a je možné jen při použití dostatečně citlivé imunoanalytické metody. Zátěžový test s inzulinem zůstává zlatým standardem pro vyšetřování osy hypotalamus – hypofýza – kůra nadledvin (HPA). Na základě stanovených hladin sérového kortizolu bylo provedeno posouzení vhodnosti záměny vysoko zátěžového testu (HDST) používajícího 250  $\mu\text{g}$  synacthenu jiným testem, který by méně zatěžoval organismus. Jako vhodný se jeví nízko zátěžový test (LDST) s aplikací 1  $\mu\text{g}$  synacthenu. V tomto případě bylo při hodnotě cut off 500 nmol/l označeno za zdravé 98,5 % osob ze skupiny, hodnocené pomocí HDST jako zdravé. Při vyhodnocování hladin aldosteronu a reninu u kontrolní skupiny měřeními v bazálním vzorku jednotlivých zátěžových testů byly nalezeny až 100% rozdíly. Není možné předpokládat, že jsou tyto odchylky způsobené onemocněním, jde zřejmě o nedodržení správného preanalytického postupu. U skupiny 63 osob byl stanoven referenční interval pro transkortin (CBG). Dobrovolníci byli rozdělení na ženy a muže. Pro ženy byl stanoven referenční interval pro sérový CBG 44,5 - 123,3 nmol/l, pro muže 38,2 – 166,0 nmol/l. Pro celou sledovanou skupinu je možné stanovit referenční interval sérového transkortinu 41,33 - 127,54 nmol/l. V průběhu ITT byly naměřeny maximální hladiny adrenokortikotropního hormonu

(ACTH) u většiny účastníků ve 40. minutě. Sérový kortizol vykazoval nejvyšší hladiny v 60. minutě. Bylo ověřeno, že inzulinem vyvolaná hypoglykémie podnítí sekreci ACTH dříve, než se začne vyplavovat kortizol.

## **Klíčová slova**

Hypokortikalismus, imunoanalýza, sérový kortizol, slinný kortizol, synacthen, zátěžové testy.

# Abstract

During this thesis – Standardisation of hypocortisolism dynamic testing – levels of hormones used when diagnosing adrenal cortex diseases were immunoanalytically determined. Examination of a control group of 66 healthy people from 19 to 68 years of age was a part of the grant project. This group underwent an insulin tolerance test (ITT) and it was confirmed that level of hypoglycaemia does not depend on age. Hypoglycaemia is partially dependent on body mass index in cases when a person's BMI is over 30. Salivary cortisol levels during the ITT reached its maximum levels at 90 minutes while serum cortisol levels were at their highest at 60 minutes. Usage of saliva during this stress test is very limited and it is possible only when using sufficiently sensitive immunoanalytical methods. An insulin stress test retains the gold standard test for the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis examination.

Substitution of a high-dose synacthen test (HDST) using 250  $\mu\text{g}$  of Synacthen was considered in order to lower body burden. A LDST when 1  $\mu\text{g}$  of Synacthen is used seem to be suitable. In this case, 98.5 % of tested people previously marked healthy by the HDST were found healthy at cut-off values of 500 nmol/l.

Evaluation of aldosterone and renin levels measured in basal samples of particular stress tests showed up to 100

Reference range for CBG was set for a group of 63 people. Volunteers were divided according to their sex. The reference range of serum CBG for women was set 44.5 – 123.3 nmol/l, for men 38.2 – 166.0 nmol/l. The reference range of serum transcortin for the whole group can be set 41,33 - 127,54 nmol/l.

During the ITT most participants reached their maximum levels of ACTH at 40 minutes. Serum cortisol showed its highest levels at 60 minutes. It was verified that insulin induced hypoglycaemia stimulates ACTH secretion before cortisol is released.

## Keywords

Hypocortisolism, immunoanalysis, serum cortisol, salivary cortisol, synacthen, stress tests

# Poděkování

Ráda bych velice poděkovala Ing. Drahomíře Springer, Ph.D za odbornou pomoc, ochotné poskytování informací, cenných rad, za velkou trpělivost, výbornou pracovní atmosféru, vstřícnost a lidský přístup. Mé poděkování také patří paní doktorce MUDr. Michaelae Duškové, Ph.D za čas, který mi věnovala při zpracování diplomové práce. Také bych ráda poděkovala paní doktorce Mudr. Kateřině Šimůnkové Ph.D za umožnění vypracovat diplomovou práci na toto téma a za cenné rady. Děkuji také panu prof. MUDr. RNDr. Luboslavu Stárkovi, DrSc. a pracovníkům ÚLBD VFN a 1.LF UK na Karlově náměstí v Praze. V neposlední řadě za morální a psychickou podporu děkuji své rodině, zejména mamince Haně Kopové a také Davidu Hrbáčkovi.

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>Teoretický úvod</b>	<b>11</b>
2.1	Kortizol . . . . .	11
2.2	Kůra nadledvin . . . . .	15
2.3	Aldosteron . . . . .	15
2.4	Renin . . . . .	17
2.5	Hypokortikalismus . . . . .	17
2.5.1	Primární adrenální insuficience . . . . .	18
2.5.2	Sekundární adrenální insuficience . . . . .	20
2.5.3	Hypopituitarismus . . . . .	21
2.5.4	Laboratorní diagnostika hypokortikalismu . . . . .	21
2.5.5	Dynamické testy . . . . .	22
2.6	Imunoanalytické metody . . . . .	24
2.6.1	Radioimunometody . . . . .	27
2.6.2	Detekce gama záření . . . . .	30
2.6.3	Další typy imunoanalytických metod . . . . .	30
<b>3</b>	<b>Experimentální část</b>	<b>34</b>
3.1	Metodika . . . . .	34
3.1.1	Princip stanovení kortizolu . . . . .	34
3.1.2	Princip stanovení CBG . . . . .	35
3.1.3	Princip stanovení reninu . . . . .	39
3.1.4	Princip stanovení aldosteronu . . . . .	40
3.1.5	Stanovení ACTH . . . . .	43
3.1.6	Provedení zátěžových testů . . . . .	43
3.2	Analytické parametry použitých metod . . . . .	44
3.2.1	Analytické parametry stanovení kortizolu . . . . .	44
3.2.2	Analytické parametry stanovení aldosteronu . . . . .	46

3.2.3	Analytické parametry stanovení reninu . . . . .	46
3.3	Materiál . . . . .	47
3.3.1	Analyzované látky . . . . .	47
3.3.2	Postup odběru vzorku . . . . .	47
3.4	Statistické postupy . . . . .	48
<b>4</b>	<b>Výsledky</b>	<b>49</b>
4.1	Sledovaný soubor . . . . .	49
4.2	Posouzení ITT a porovnání hladin kortizolu v séru a slinách . . . . .	49
4.3	Posouzení vhodnosti zátěžových testů s různými dávkami synacthenu	56
4.4	Posouzení imunoanalytických metod z analytického hlediska . . . . .	56
4.5	Stanovení hladiny aldosteronu a reninu . . . . .	57
4.6	Stanovení referenčního intervalu CBG . . . . .	59
4.7	Sledování hladin ACTH v průběhu inzulínového testu . . . . .	61
<b>5</b>	<b>Diskuze</b>	<b>62</b>
5.1	Sledovaný soubor . . . . .	62
5.2	Posouzení inzulínového testu a porovnání hladin kortizolu v séru a slinách . . . . .	62
5.3	Posouzení vhodnosti zátěžových testů s různými dávkami synacthenu	64
5.3.1	Inzulínový toleranční test . . . . .	65
5.3.2	Zátěžový test s vysokou dávkou synacthenu . . . . .	66
5.3.3	Zátěžový test s nízkou dávkou synacthenu . . . . .	66
5.3.4	Zátěžový test se střední dávkou synacthenu . . . . .	67
5.4	Imunoanalytické metody . . . . .	67
5.5	Stanovení hladiny aldosteronu a reninu . . . . .	69
5.6	Stanovení referenčního intervalu CBG . . . . .	70
5.7	Sledování hladin ACTH v průběhu inzulínového testu . . . . .	71
<b>6</b>	<b>Závěr</b>	<b>73</b>
<b>7</b>	<b>Seznam příloh</b>	<b>81</b>



# Přehled použitých zkratk

ACTH	Adrenokortikotropní hormon
AI	Adrenokortikální insuficience
BMI	Index tělesné hmotnosti (Body mass index)
cAMP	Cyklický adenosinmonofosfát
CBG	Globulin vázající kortikosteroidy, též označován jako transkortin
CS	Cushingův syndrom
CRH	Kortikotropin uvolňující hormon, též označován jako kortikotropin
EHK	Externí hodnocení kvality
HDST	Vysoko zátěžový test ( High - dose short Synacthen test)
IRMA	Imunoradiometrická analýza
LC-MS/MS	Kapalinová chromatografie v kombinaci s tandemovou hmotnostní spektrometrií
ITT	Inzulinový toleranční test
LDST	Nízko zátěžový test (Low – dose short Synacthen test)
MDST	Středně zátěžový test (Medium – dose short Synacthen test)
RIA	Radioimunoanalýza
SEKK	Systém externí kontroly kvality

# 1 Úvod

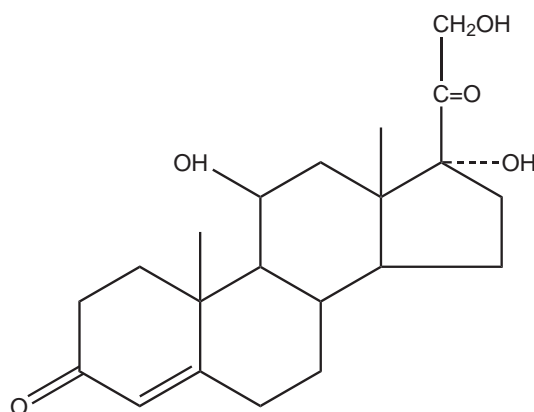
Hypokortikalismus je vzácné a závažné onemocnění, k jehož odhalování se využívá dynamických zátěžových testů, jejichž posuzování bylo součástí této diplomové práce. Změny hladin kortizolu jdou ruku v ruce se změnami hladin i jiných důležitých hormonů, jejichž stanovení jsou vhodnou součástí diagnostiky a monitorování endokrinologických poruch, zejména Addisonovy choroby. Metody stanovení koncentrací těchto hormonů, a tím i výsledky, se mohou lišit na základě použité imunoanalýzy. V rámci této práce byl stanoven kortizol pomocí automatizované chemiluminiscenční imunoanalýzy. Aldosteron, renin, adrenokortikální hormon (ACTH) a vazebný protein pro kortizol (CBG) byly stanovovány pomocí radioimunoanalýzy.

Prvořadým cílem bylo vyhodnotit inzulinový test u kontrolního souboru osob a zvážit vhodnost slin jako biologického materiálu namísto běžně odebíraného materiálu – krve. Druhým cílem bylo posoudit vhodnost jednotlivých zátěžových testů používaných k odhalování hypokortikalismu. Dalším cílem bylo stanovit hladiny aldosteronu a reninu u kontrolního souboru osob a ověřit použitelnost referenčních intervalů pro dané hormony, které uvádí výrobce v dokumentaci k metodě. Úkolem bylo také stanovit referenční interval pro transkortin (CBG) z výsledků získaných v kontrolní skupině. Posledním cílem této práce bylo sledovat hladiny ACTH v průběhu inzulinového testu ve zmiňované skupině kontrol.

## 2 Teoretický úvod

### 2.1 Kortizol

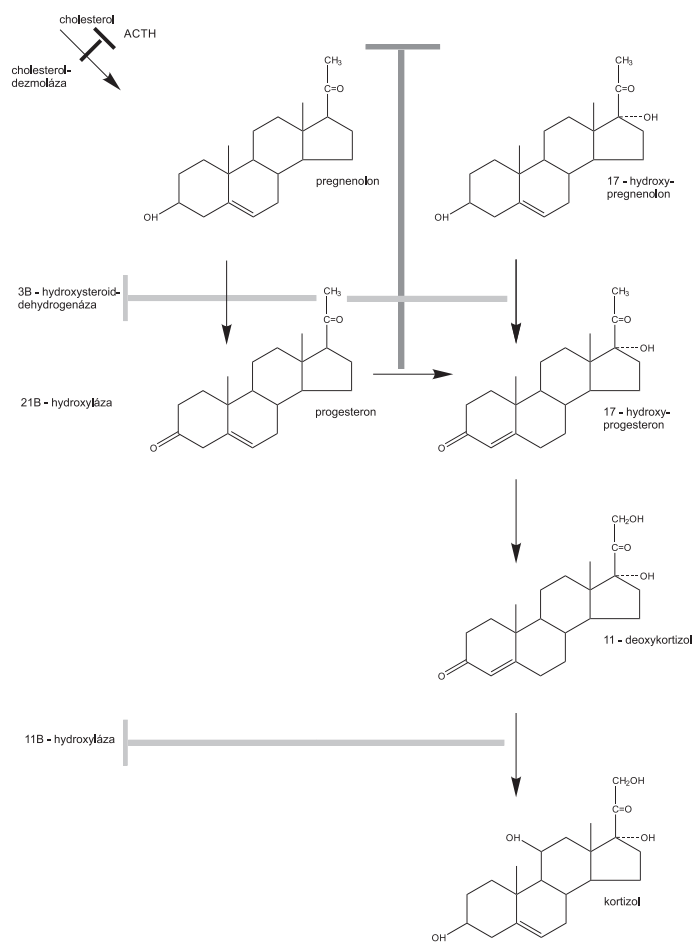
Kortizol je nejběžnější cirkulující steroidní hormon v lidském těle. Kortizol, někdy nazývaný také hydrokortizon, je nejúčinnější hormon ze skupiny glukokortikoidů. Jeho tvorba probíhá v kůře nadledvin. Cyklopentanoperhydrofenanthrenová kostra se čtyřmi kruhy je základem všech steroidních hormonů včetně kortizolu. Strukturně je kortizol (Obr. 2.1) řazen mezi adrenokortikální steroidy s 21 uhlíky. V pozici 17 mají hydroxylovou skupinu, a proto mohou být nazývány také 17-hydroxykortikoidy nebo 17-hydroxykortikosteroidy [1].



Obrázek 2.1: Kortizol

Společně s ostatními hormony kůry nadledvin je i kortizol syntetizován z cholesterolu. Zdrojem cholesterolu jsou z 80 % plazmatické lipoproteiny (LDL, HDL) [2]. V podobě lipoproteinových částic vstupuje endocytózou do buňky, kde působením enzymů podléhá rozkladu a je využit k tvorbě příslušného hormonu. Jedná se o sérii enzymatických reakcí, které probíhají ve dvou buněčných organelách: v mitochondriích a v endoplazmatickém retikulu (ER). Pro syntézu kortizolu je nezbytná přítomnost konkrétních enzymů, z nichž každý je typický právě buď pro mitochondrie, nebo ER. Proto je při steroidogenezi zapotřebí neustálých přesunů substrátu do mitochondrií a ven. Celkový mechanismus biosyntézy kortizolu je na (Obr. 2.2).

Skladování steroidního hormonu kortizolu v nadledvinách je jen výjimečné. Hned poté, co je ukončena jeho syntéza, je transportován buňkami nadledvin do plazmy.

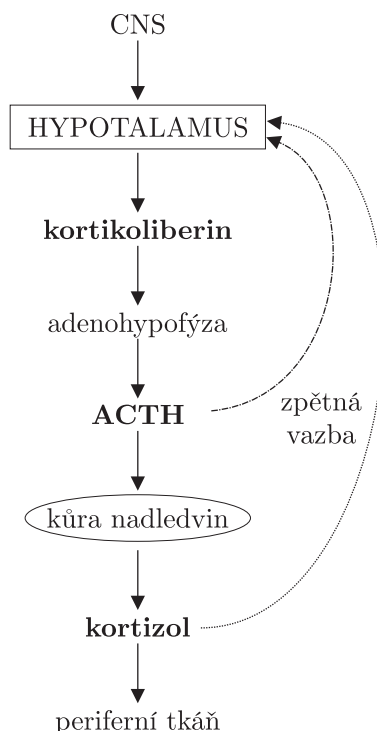


Obrázek 2.2: Biosyntéza kortizolu

Syntéza a produkce kortizolu je regulována osou hypotalamus – hypofýza – kůra nadledvin (HPA) [3,4]. Osu HPA aktivují fyziologické i psychické stresové podněty.

Celá kaskáda je spuštěna uvolněním neurosekrečního peptidu kortikotropin uvolňujícího hormonu (CRH) z hypotalamu [4,5]. CRH je přenesen portálním krevním oběhem do předního laloku hypofýzy. Zde se projeví vlastnost CRH jako liberinu podnítit sekreci adrenokortikotropního hormonu (ACTH). Krevním oběhem se ACTH dostane k adrenokortikálním buňkám nadledvin, kde stimuluje sekreci kortizolu, která se během dne pohybuje kolem 16 – 20 mg [2].

Osa HPA podléhá negativní zpětné vazbě kortizolu (Obr. 2.3). Po vytvoření v periferní endokrinní žláze se kortizol transportuje zpět do hypotalamu [5]. Receptory zde přítomné rozpoznají kortizol a ovlivní sekreci liberinu, tedy CRH, který má dále vliv na produkci ACTH. To znamená, že pokud je uvolněno větší množství ACTH, je koncentrace kortizolu v krvi nižší [1]. Naopak stimulace produkce ACTH je tím slabší, čím více je kortizolu v krvi.



Obrázek 2.3: Negativní zpětná vazba

Uvolňování kortizolu je periodické a je řízeno diurnálním rytmem sekrece ACTH. Jedná se o 24 hodinové, s individuálními rozdíly až 25 hodinové cykly s opakujícími se změnami sekrece kortizolu [2]. ACTH je uvolňován v průběhu celého dne v nepravidelných pulzech. Po těchto pulzech vzrůstá hladina kortizolu v krvi a naopak mezi pulzy kortizolémie klesá [1]. Koncentrace kortizolu v krvi je nejvyšší v ranních hodinách (4.00 – 10.00) v důsledku častějších pulzů. Naopak nejméně časté jsou pulzy večer a v noci, kdy je hladina kortizolu velice nízká často až nedetekovatelná [6].

Celý tento proces je řízen takzvanými biologickými hodinami, které jsou lokalizované v suprachiasmatických jádrech hypotalamu [6]. Kortizol působí jako druhý posel mezi centrálními a periferními biologickými hodinami, proto má význam v synchronizaci tělesných cirkadiánních rytmů. Nedostatek spánku, stres, deprese nebo stárnutí mohou vést ke změně cirkadiánního a ultradiánního rytmu.

Kortizol cirkuluje v krvi vázán na nosné proteiny řadící se mezi  $\alpha$ -globuliny. Přibližně z 70 – 80 % koluje v krvi ve specifické vazbě na globulin vázající kortikosteroidy (CBG) neboli transkortin [7]. Menší množství kortizolu váže albumin. Přibližně 15 – 20 % plazmatického kortizolu. Vazba na albumin vzrůstá se zvyšující se koncentrací kortizolu v plazmě a po dosažení plné saturace CBG kortizolem (pokud koncentrace přesáhne  $> 20 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ ) [1]. V biologicky aktivní formě se vyskytuje asi 8 % kortizolu, který zůstal volný [5]. Jen volná frakce může vstoupit do

tkáně a šířit se přes buněčnou stěnu do cytosolu, vázat se na intracelulární receptor glukokortikoidů a fungovat jako zásobárna kortizolu pro tkáně. Naopak vázaný kortizol je fyziologicky inaktivní [3].

CBG je plazmatický globulin, který vykazuje vysokou afinitu ke kortizolu na rozdíl od ostatních steroidních hormonů. Syntéza CBG probíhá v játrech a je zvyšována estrogy. Hladina transkortinu je zvýšená v období těhotenství, u žen užívajících perorální estrogy. Naopak se snižuje při cirhóze, nefróze nebo mnohočetném myelomu [1].

Kortizol má široké spektrum biologických účinků. Ty nejčastější a nejvýznamnější jsou shrnuty v následujících bodech.

#### 1. Účinky na intermediární metabolismus.

- Sacharidy – zvyšuje jaterní glykogenezi a glukoneogenezi. Aktivita glukóza-6-fosfatázy se zvyšuje a stoupá glykémie [1]. Šetří glukózu potřebnou pro mozek snížením vychytávání glukózy ze svalů.
- Lipidy – kortizol zvyšuje lipolýzu. Tím dochází k uvolnění mastných kyselin a glycerolu, které se využijí pro glukoneogenezi.
- Proteiny – inhibuje tvorbu proteinů a zrychluje jejich rozpad, především v pojivové tkáni. V tomto případě působí proteokatabolicky. Příkladem je řídnutí kostí, snížení syntézy kolagenu, ztenčení kůže nebo zpomalení hojení ran [5].

#### 2. Účinky na kardiovaskulární systém.

- Zvyšuje sílu srdeční kontrakce, srdeční výdej i krevní tlak díky působení na katecholaminy. Udržuje oběhové funkce stimulací kardiovaskulárního systému.

#### 3. Účinky na imunitní systém

- Kortizol působí imunosupresivně a protizánětlivě. Glukokortikoidy potlačují projevy alergických onemocnění. Uvedené účinky glukokortikoidů jsou často využívány léčebně.

Dále kortizol působí na rovnováhu vody a elektrolytů, zvyšuje produkci erythropoetinu, ovládá stresové situace, neboli komplexním působením zjišťuje homeostázu organismu při stresu [3, 4]. Působí také na změny chování, kdy zvýšené množství vede k euforii, naopak jeho nedostatek vyvolává depresi [5].

Při dlouhodobé terapii glukokortikoidy může dojít k ovlivnění vylučování kortizolu, neboť pravidelně podávané vysoké dávky kortizolu utlumují negativní zpětnou vazbou aktivitu HPA osy. Naopak náhlým vysazením vysokých dávek glukokortikoidů může dojít k selhání určitých funkcí, které jsou glukokortikoidy řízeny.

Produkce glukokortikoidů kůrou nadledvin je nezbytná pro ochranu zdraví. Přebytek nebo nedostatek těchto hormonů vyvolává závažná klinická onemocnění. V případě nadbytečného vylučování kortizolu se jedná o Cushingův syndrom (CS). Naopak snížená sekrece kortizolu je příčinou hypokortikalismu, tedy Addisonovy choroby (AD).

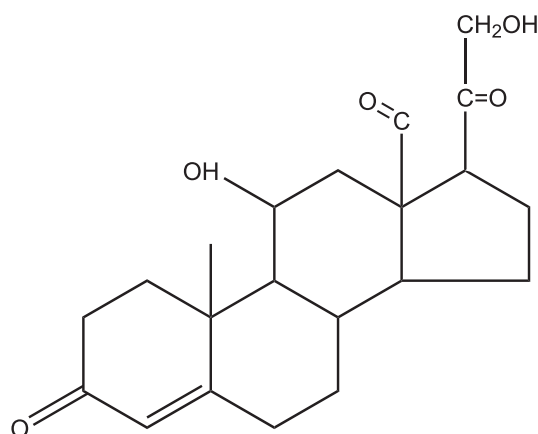
## 2.2 Kůra nadledvin

Nadledviny leží na horních pólech ledvin uložené v tukovém pouzdře. Jsou tvořeny pro život nezbytnou kůrou a dření, která je tvořena přeměněnými ganglii. Kůra nadledvin tvoří tři skupiny steroidních hormonů [8]. Ty jsou sestaveny na základě hlavních účinků hormonů. V první vrstvě kůry – zona glomerulosa – jsou produkovány mineralokortikoidy (aldosteron), střední vrstva – zona fasciculata – produkuje glukokortikoidy (kortizol) a vnitřní vrstva – zona reticularis – uvolňuje zejména androgeny, v menší míře pak glukokortikoidy. Biologické aktivity všech vyplavovaných hormonů se překrývají, a proto všechny přirozené glukokortikoidy mají i aktivitu mineralokortikoidů a naopak. Za tuto aktivitu jsou zodpovědné elementy hormonální odpovědi zprostředkovávající typické účinky hormonů na genové úrovni. To, jaký konkrétní hormon vznikne, je závislé na enzymatickém vybavení buňky dané vrstvy kůry.

## 2.3 Aldosteron

Aldosteron je hlavní a nejúčinnější hormon ze skupiny mineralokortikoidů. Je secernován ve velice malé míře z kůry nadledvin. Aldosteron (Obr. 2.4) se stejně jako kortizol řadí k  $C_{21}$  steroidním hormonům, jehož základem je cyklopentanoperhydrofenantrenové jádro.

Hladina aldosteronu v krvi je nízká. V krvi cirkuluje aldosteron vázaný ve většině případů na albumin a na CBG. Receptory vážící aldosteron se nachází jak v cytoplazmě, tak v jádrech cílových buněk. Těmi jsou nejčastěji buňky distálního tubulu a sběrných kanálků ledvin [9]. Po vazbě na receptory v cytosolu těchto buněk dojde

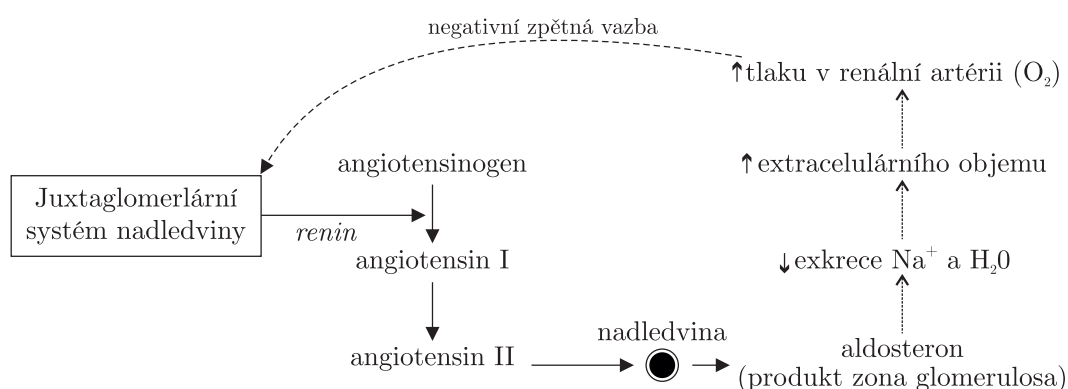


Obrázek 2.4: Aldosteron

aktivací transkripce mRNA v jádře k aktivaci mnoha pochodů. Tyto pochody jsou podstatou účinku mineralokortikoidů.

Ovládání transportu vody a iontů je hlavní mineralotropní účinek. Podstatou je navození tvorby specifických proteinů — iontové kanály,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasy a  $\text{H}^+$ -ATPasy [9]. Tím se zvýší resorpce  $\text{Na}^+$  iontů z tubulární tekutiny a exkrece  $\text{K}^+$  iontů a  $\text{H}^+$  z buněk sběracích kanálků. Zadržováním  $\text{Na}^+$  iontů v těle se zvyšuje objem osmotického tahu vody (ECT). Důležitý je také vazokonstrikční účinek.

Sekrece aldosteronu je regulována především ledvinami (Obr. 2.5). Čím vyšší je syntéza reninu, tím více stoupá produkce aldosteronu [5]. Podnětem tvorby a sekrece aldosteronu je zvýšená koncentrace  $\text{K}^+$  iontů a vzestup angiotenzinu II a III. Ty vznikají atakem reninu na angiotenzinogen. Stimulujícím faktorem pro sekreci aldosteronu je pokles tlaku krve, který aktivuje právě systém renin – angiotenzin.



Obrázek 2.5: Regulace sekrece aldosteronu

Vysoká sekrece aldosteronu způsobuje Connův syndrom, který je vyvolaný nádorovým bujením kůry nadledvin [10]. Tento primární hyperaldosteronismus je vy-



volán poklesem reninu, tedy hypokalémií a hypertenzí. Sekundární hyperfunkce je způsobena zvýšenou funkcí juxtaglomerulárních buněk tedy jak zvýšenou hladinou reninu, tak aldosteronu [1]. Hypertenze, polyurie nebo žízeň jsou hlavními příznaky.

Naopak hypoaldosteronismus je dán poklesem  $\text{Na}^+$ , nárůstem  $\text{K}^+$  a objem ECT začne klesat [10]. Nedostatek aldosteronu způsobuje dehydrataci, nastává cirkulační selhání a během několika dnů může dojít i ke smrti. Typickými příznaky nedostatku aldosteronu jsou únava, svalová bolest, hypotenze či tachykardie. Spíše než mineralkortikoidy postihuje hypofunkce glukokortikoidy v podobě AD.

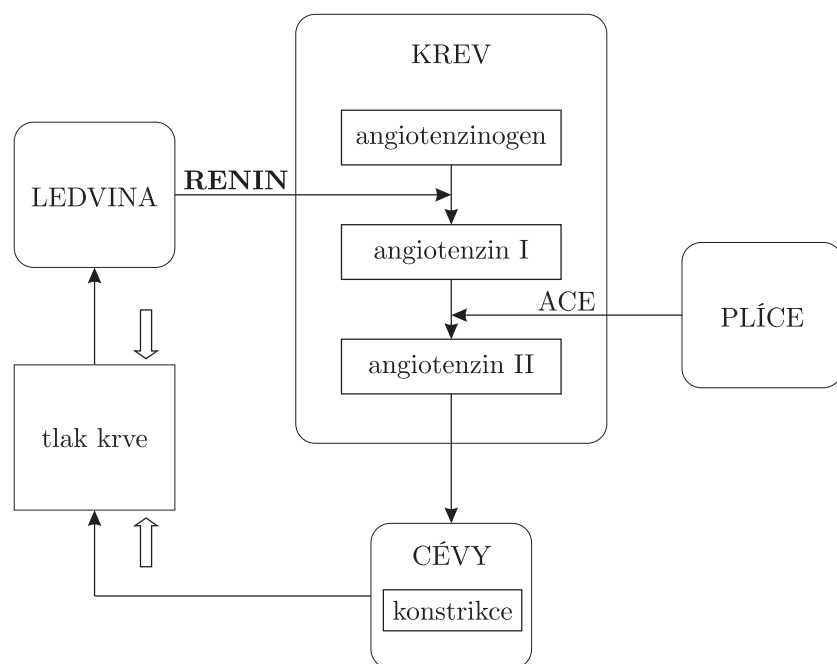
## 2.4 Renin

Renin se tvoří v blízkosti glomerulů v kůře nadledvin. Je to hormon juxtaglomerulárního aparátu ledvin. Není to hormon v pravém slova smyslu, má spíše vlastnosti enzymu, neboť štěpí  $\alpha$ -2-globulin – angiotenzinogen na angiotenzin I [9]. Tento dekaeptid je prostřednictvím angiotenzin – přeměňujícím enzymem (ACE) konvertován na oktaeptid - angiotenzin II, který zvyšuje tlak. Asi čtvrtina angiotenzinu II se pak přemění na angiotenzin III, heptaeptid [5]. Renin je tedy jakýsi spouštěč renin-angiotenzinového systému, který ovlivňuje vylučování vody a iontů ledvinami. Tento regulační mechanismus (Obr. 2.6) je aktivován poklesem průtoku krve ledvinami. Mechanismus renin-angiotenzin udržuje oběhové funkce při poklesu krevního tlaku. Dalším účinkem je aktivace sympatiku a stimulace sekrece aldosteronu.

Zvýšená sekrece reninu a angiotenzinu II vede ke stavu, který se nazývá hyperreninový aldosteronismus. Ke zvýšené produkci reninu dochází vlivem hyponatremie a dehydratace. Nedostatečná tvorba reninu v juxtaglomerulárním aparátu ledvin vede k hyporeninovému hypoaldosteronismu. Často se vyskytuje u starších lidí s diabetem nebo u nemocných s AIDS či různými chorobami ledvin [10].

## 2.5 Hypokortikalismus

Hypokortikalismus neboli adrenokortikální insuficience (AI) je stav snížené tvorby a produkce hormonů kůry nadledvin. Primární adrenokortikální insuficience (periferní hypokortikalismus) vzniká na podkladě postižení kůry nadledvin. Sekundární adrenokortikální insuficience (centrální hypokortikalismus) vzniká v důsledku postižení hypotalamo-hypofyzárního systému a následně nedostatečné stimulace kůry nadledvin.



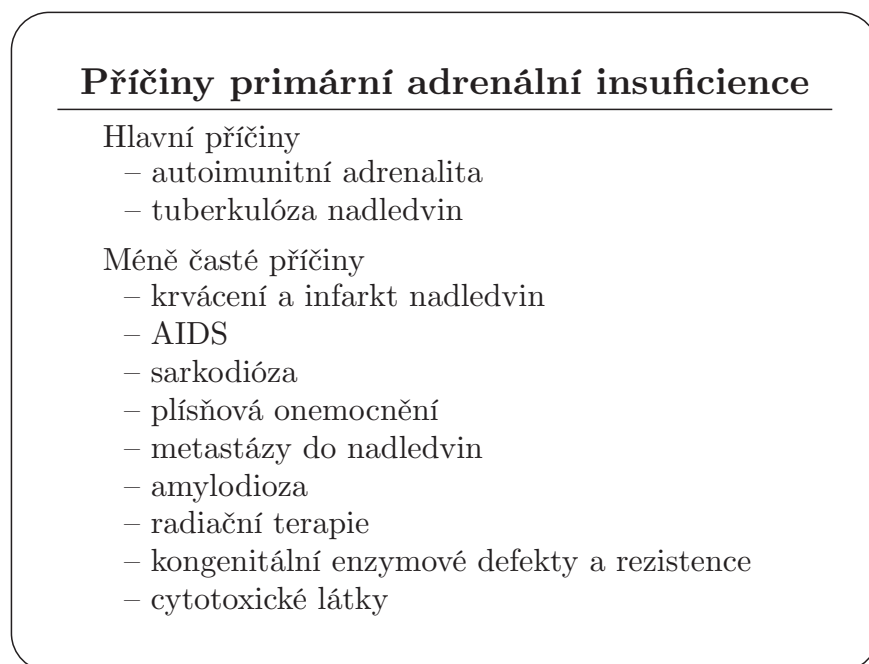
Obrázek 2.6: Řízení tlaku krve systémem renin-angiotenzin

### 2.5.1 Primární adrenální insuficience

Primární AI byla poprvé popsána v roce 1855 britským lékařem Thomasem Addisonem, podle kterého se také nazývá Addisonova choroba [11]. U pacientů s periferní AI se projevují příznaky, které vyplývají jak z nedostatku glukokortikoidů, tak z nedostatku mineralokortikoidů. U žen může být výrazný i androgenní deficit [12]. Addisonova choroba je velice vzácné onemocnění, jehož celkový výskyt není přesně znám. Incidence této choroby je odhadována na 10 – 15 pacientů z 1 000 000 obyvatel. Manifestace příčin nedostatečnosti kůry nadledvin nastává většinou, až když je zničeno přibližně 90 % její tkáně [13].

Hlavní příčinou AI je v dnešní době autoimunitní etiologie [11–14, 16]. Diagnóza autoimunitního postižení nadledvin je založena na měření cirkulujících protilátek proti nadledvinám, 21- $\alpha$ -hydroxylázy – enzymu z rodiny cytochromu P450 [12, 15, 16]. Přibližně polovina pacientů s AI má jiné, koexistující autoimunitní onemocnění, jako je hypoparathyreosa, chronická mukokutánní kandidosa, Hashimotova thyroditis nebo diabetes mellitus typu 1 [11–13]. Jedná se pak o onemocnění, která jsou součástí autoimunitního polyglandulárního syndromu. V minulosti byla nejčastější příčinou primární adrenokortikální insuficience tuberkulóza, která v dnešní době přetrvává spíše v méně rozvinutých zemích [17]. Oboustranné postižení nadledvin je způsobeno hemoragickými poruchami, metastázami maligních tumorů či lymfomů nebo amyloidozou. Méně častou, avšak prokázanou, příčinou poškození je virus

HIV [12, 13]. Příčiny primární AI jsou shrnuty na obrázku (Obr. 2.7).

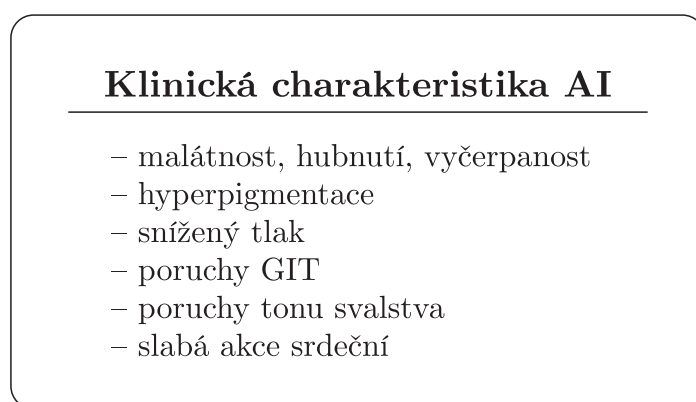


Obrázek 2.7: Příčiny primární AI

Symptomy se mohou jak u primární, tak u sekundární AI projevovat velice pomalu a nedostatečnost nadledvin může být v počátcích velice podceněna [14]. Únava, slabost, gastrointestinální poruchy spojené s nechutenstvím, anorexie, deprese, úporné zvracení, hypoglykemie, úbytek váhy u dospělých, hypotenze či hyperkalemie jsou výčtem příznaků, se kterými může být nedostatečnost nadledvin zaměněna. Vzhledem k nespecifičnosti příznaků může být stanovení správné diagnózy komplikované. Klinické příznaky závisí na mnoha faktorech, především na tom, zda se jedná o akutní nebo chronickou AI.

Akutní primární AI vzniká v důsledku nepoměru mezi potřebou a produkcí glukokortikoidů, event. mineralokortikoidů [4, 18]. Vyskytuje se u pacientů s AI, kteří jsou vystaveni stresu v důsledku operace, infekce nebo traumatu. Vážná hypotonie, hyperkalemie nebo acidóza jsou způsobeny renálními ztrátami sodíku a retencí draslíku v důsledku snížené tvorby mineralokortikoidů. Dalšími klinickými příznaky jsou již výše zmíněná anorexie, nauzea a zvracení, které způsobují snížení cirkulujícího volumu a tím dehydrataci, hypotenzi, tachykardii a mohou se objevit i poruchy vědomí až kóma. Akutní adrenální krize je život ohrožující stav, který vyžaduje okamžitou léčbu, neboť neléčená či pozdě léčená akutní krize může končit letálně [11, 12]. Zpočátku nespecifickými příznaky se projevuje chronická AI.

Únava, slabost, vyčerpanost či nevykonnost jsou hlavními symptomy, které mohou s rozvíjejícím se onemocněním přerůst v poruchy psychické nebo poruchy kognitivních funkcí [13]. Chronická nedostatečnost však může poměrně rychle vyústit v akutní AI, například v důsledku traumatu, celkové anestezie či významné fyzické zátěže. Klasickým rysem Addisonovy choroby je hyperpigmentace [12, 13, 16]. Vyskytuje se v důsledku zvýšené koncentrace proopiomelanokortinu (POMC). Výrazně zvýšená je v místech otlaku a na místech, která jsou vystavena slunečnímu záření, jako jsou rýhy na dlani, lokty, kolena, kotníky. Hyperpigmentací bývá také postižena ústní sliznice a dásně. Klinické příznaky akutní i chronické AI jsou shrnuty na obrázku (Obr. 2.8).



Obrázek 2.8: Příznaky akutní a chronické AI

### 2.5.2 Sekundární adrenální insuficience

Sekundární (centrální) AI je způsobena nedostatkem ACTH, v důsledku zničení buněk, které tento hormon produkují. U centrální AI jsou postiženy hormony [13]. Centrální AI se vyskytuje při hypopituitarismu různé etiologie, jako jsou tumory hypotalamo-hypofyzární oblasti či metastatická poškození, která vedou k hyposekreci hypofyzárního ACTH [19]. U pacientů po dlouhodobé glukokortikoidní terapii nebo po odstranění příčiny endogenního CS se vyskytuje funkční centrální nedostatečnost [17]. Klinické příznaky, ke kterým patří letargie, únava, anorexie, myalgie jsou spíše nespecifické. U sekundární adrenokortikální nedostatečnosti se jedná převážně o chronickou formu. V případě fyzické a psychické zátěže, se může objevit i krize akutní, pokud u pacientů léčených kortikosteroidy není zvýšena substituční dávka [12]. V důsledku snížené sekrece ACTH z hypofýzy nenacházíme

u sekundární AI hyperpigmentaci, a proto se nemocným lidem v takovém případě často říká „bílí Addisoni“.

### 2.5.3 Hypopituitarismus

Jedná se o hypofunkci charakterizovanou nedostatečnou produkcí alespoň jednoho z hormonů předního nebo zadního laloku hypofýzy [20]. Hypopituitarismus je komplexní zdravotní stav spojený se zvýšenou nemocností a úmrtností.

Postihuje 10 – 15 ze 100 000 pacientů a podle rozsahu postižení jednotlivých hormonů se rozlišuje centrální nebo perferní hypopituitarismus. Léčba je v tomto případě složitější a vyžaduje celoživotní endokrinologický dohled.

Nejčastější příčinou vzniku hypopituitarismu jsou adenomy hypofýzy [20]. Hypopituitarismus vzniká ale i v důsledku jejich chirurgického ošetřování či radioterapie. Makroadenomy ( $> 1$  cm) jsou ve 30 % případů spojeny s rozvojem částečného nebo úplné hypopituitarismu, který vzniká v důsledku tlaku na zdravou tkáň hypofýzy. K dalším příčinám patří metastatická postižení (prsí, plicní metastázy a metastázy karcinomu prostaty), poranění hlavy, infekce, mykózy nebo gliomy očního nervu.

Príznaky hypopituitarismu odpovídají nedostatku jednotlivých hormonů. Při většině procesů bývá nejčastěji postižena sekrece růstového hormonu (porucha růstu v dětství a v dospívání, metabolické změny a psychocké změny u dospělých) a gonadotropinů (centrální hypogonadismus), pak tyreotropinu (centrální hypotyreóza), ACTH (centrální hypokortikalismus) a nakonec prolaktinu [21].

### 2.5.4 Laboratorní diagnostika hypokortikalismu

Diagnóza AI by měla být potvrzena vyšetřením funkce osy HPA. Léčba potvrzené AI by se neměla odkládat, zároveň není přípustné vystavit pacienta situacím, jejichž důsledkem je ztráta tekutin, dehydratace a prohloubení hypotenze [13]. U akutně nemocného pacienta je nutné okamžité zahájení terapie. Diagnóza se určuje až po stabilizaci stavu. Průkazem primární AI je nález sérového či plazmatického kortizolu pod hranicí normálního rozmezí, hladina ACTH je výrazně zvýšena [12]. Průkaz AI se posuzuje z hodnot kortizolu v plazmě či v séru. Stanovení se provádí mezi 7 – 8 hodinou ranní z důvodu diurnálního rytmu kortizolu. Pacient je lačný, stanovení se provádí před užitím ranní dávky glukokortikoidů nebo jsou delší dobu vysazeny. Stanovuje se jak volný, tak kortizol vázaný na CBG.

Hodnoty pod 100 nmol/l jednoznačně prokazují diagnózu AI, hodnoty nad 400 nmol/l s velkou pravděpodobností hypokortikalismus vylučují [22, 23].

Parciální insuficienci nasvědčují hodnoty v rozmezí 150 – 450 nmol/l. V takovém případě, pokud je podezření na AI, je dobré provést některý z dynamických testů. Aby mohla být odlišena primární a sekundární insuficience, provádí se stanovení hladin ACTH v plazmě [13]. V případě primární insuficience jsou hladiny ACTH v plazmě mnohonásobně vyšší než 44,4 pmol/l. Koncentrace plazmatického ACTH pod 4,4 pmol/l je průkazem sekundární AI.

### 2.5.5 Dynamické testy

U pacientů s parciálním hypokortikalismem se bazální hodnoty sérového kortizolu vyskytují v tzv. „šedé zóně“. V tomto případě se není možné vyjádřit ke konkrétnímu stavu nadledvin, a proto by se mělo dbát na provedení dynamických stimulačních testů, které dokáží danou nedostatečnost odhalit [20].

#### Inzulinový toleranční test

Inzulinový toleranční test (ITT) je považován za zlatý standard pro hodnocení funkce HPA osy [24–26]. Jedná se o test s hypoglykemií vyvolanou inzulinem [20,27]. Dávka inzulinu je určována podle hmotnosti pacienta. Intravenózní aplikace inzulinu vede k vyvolání extrémní hypoglykémie (pod 2,2 mmol/l). V rámci stresového mechanismu dochází k uvolnění ACTH, který indukuje sekreci kortizolu. V tomto případě funguje kortizol jako jakýsi hormonový, resp. inzulinový protiregulator.

Před samotným provedením ITT je vhodné stanovení bazální hladiny kortizolu v séru či plazmě [15]. Koncentrace menší než 100 nmol/l upozorňuje na nebezpečí vyvolání hypokortikální krize a ITT se proto neprovádí a diagnóza hypokortikalismu je při této koncentraci kortizolu prokázána. Test je pro pacienta velice nepříjemný a potenciálně nebezpečný, a proto musí být prováděn vždy za přítomnosti zdravotnického pracovníka [24]. Je velice nebezpečný pro novorozence, kojence, děti do 4 let a pro starší pacienty [26].

Před zahájením testu by měla být ranní glykémie kolem 3,3 mmol/l [27]. Poté se zavede injekčně bolus humánního inzulinu, jehož množství závisí na tom, zda je pacient citlivý nebo rezistentní vůči inzulinu. Kortizolémie se stanovuje vždy po 30 minutách po dobu dvou hodin. Pokud dojde v průběhu testu k dosažení maximální hodnoty po stimulaci nad 500 nmol/l, může být hypokortikalismus vyloučen [15,20].

V případě nežádoucích účinků jako je pocení, bušení srdce, křeče, kóma či šok musí okamžitě následovat stanovení glykémie a hladin hormonů v krvi [27]. Poté je nutné podat intravenózně bolus 40% glukózy a následně infuze 10 – 20% glukózy.

Právě z důvodů minimalizace nežádoucích účinků a rizik je někdy lepší pro stimulaci kortizolu použít ACTH stimulační testy.

### **Testy s analogy ACTH (zátěžové testy)**

Při podezření na primární či sekundární AI se využívá vyšetření pomocí krátkých testů s analogy ACTH (Short Synacthen Test) [26,28]. Jedná se o syntetický analog ACTH, který se skládá z prvních 24 aminokyselin přirozeně se vyskytujícího ACTH se stejným biologickým účinkem. Nazývá se také tetrakosaktid, komerčně synacthen. Intravenózní dávkou ACTH se ověří jeho schopnost se vázat na receptory nadledvin a stimulovat tak sekreci kortizolu [27].

Test je prováděn na lačno. U žen je nutné provedení mezi 3. – 8. dnem cyklu, před vyšetřením musí být vysazena hormonální antikoncepce (HAK), neboť by mohlo dojít k ovlivnění naměřených koncentrací kortizolu.

Po zjištění bazální hodnoty odběrem krve se nemocnému aplikuje intravenózně ampule syntetického analogu ACTH v bolusu. Poté se hodnotí koncentrace kortizolu v séru za 30 a 60 minut po stimulaci ACTH [11, 20]. Insuficience kůry nadledvin je vyloučena pokud koncentrace kortizolu v plazmě či séru přesáhne 550 nmol/l [16, 26, 27]. Někdy je hranice posunuta až k 600 nmol/l, čímž se vyloučí falešně pozitivní výsledky [17]. Při čerstvě vzniklé insuficienci HPA osy není možné tento test provádět, neboť atrofie nadledvinové kůry není dostatečně vyvinuta.

Nejčastěji používaný je HDST test (High-dose Short Synacthen Test) [26]. V tomto případě je pacientovi aplikována dávka 250  $\mu$ g synacthenu [11]. Postup tohoto testu je stejný jako u výše popsaného testu. Spolehlivější výsledky přináší test, kdy je pacientovi, též vleže, intravenózně aplikován 1  $\mu$ g syntetického ACTH jako bolus. V tomto případě se jedná o tzv. LDST test (Low-dose short Synacthen Test). Koncentrace sérového/plazmatického kortizolu se hodnotí v 0. minutě - bazální hodnota a ihned po podání, ve 20. minutě, 30., 40. a 60. minutě. Při testu s nízkou dávkou tetrakosaktidu má kortizol stimulační vrchol za 20 minut [15].

### **Další dynamické testy**

Alternativním způsobem zjištění nadledvinové nedostatečnosti je metyraponový test [27]. Je indikován spíše při podezření na sekundární AI a testuje funkčnost HPA osy po dlouhé léčbě steroidními látkami. Metyrapon blokuje enzym 11 $\beta$ -hydroxylázu a tím i konečný krok k tvorbě kortizolu v nadledvinách. Pokles kortizolu v krvi vede u zdravých pacientů ke zpětnovazebné stimulaci sekrece ACTH.

Pokud se jedná o krátkou formu testu, je možné ambulantní provedení. Po prvním odběru krve, tedy po zjištění bazální hodnoty na stanovení ACTH, kortizolu a 11-deoxykortizolu se o půlnoci společně s menším množstvím jídla podá per orálně tableta metyraponu (30 – 40 mg/kg tělesné váhy) [17]. V 8.00 následujícího dne se provede odběr krve na stanovení 11-deoxykortizolu. Dostatečná funkce kortikotropní osy je potvrzena při vzestupu hladiny sérového 11-deoxykortizolu nad 200 nmol/l a vzestupu ACTH nad 200 pg/ml. Další možností je dlouhá varianta testu, při které se provádí sběr moči za 24 hodin na stanovení 17-hydroxykortikoidů. Sběr se provádí po dobu 4 dnů a v době mezi 3. až 4. dnem testu je zaznamenán dvojnásobný až čtyřnásobný nárůst exkrece 17-hydroxykortikoidu močí. Nestimulované koncentrace se pohybují do 3,2 nmol/l. Tyto hodnoty koncentrací jsou stejné i pro dlouhé provedení testu.

Tento test je nejen velice nepříjemný, ale také kontraindikován u pacientů s těžkou nedostatečností nadledvin [26]. Kromě toho stanovení 11-deoxykortizolu je obtížné a dražší, než je měření kortizolu. Stejně tak jako kvůli nízké senzitivitě metyraponového testu se nedoporučuje test s kortikoliberinem (CRH).

Hypotalamický CRH stimuluje sekreci ACTH z hypofýzy. Při podezření na hypofyzární insuficienci je indikován test s CRH, kdy je ležícímu pacientovi podána dávka 100  $\mu$ g CRH intravenózně. Následně se provádí náběry pro stanovení kortizolu v určitých časových intervalech.

Výběr a použití dynamických testů je shrnut na (Obr. 2.9).

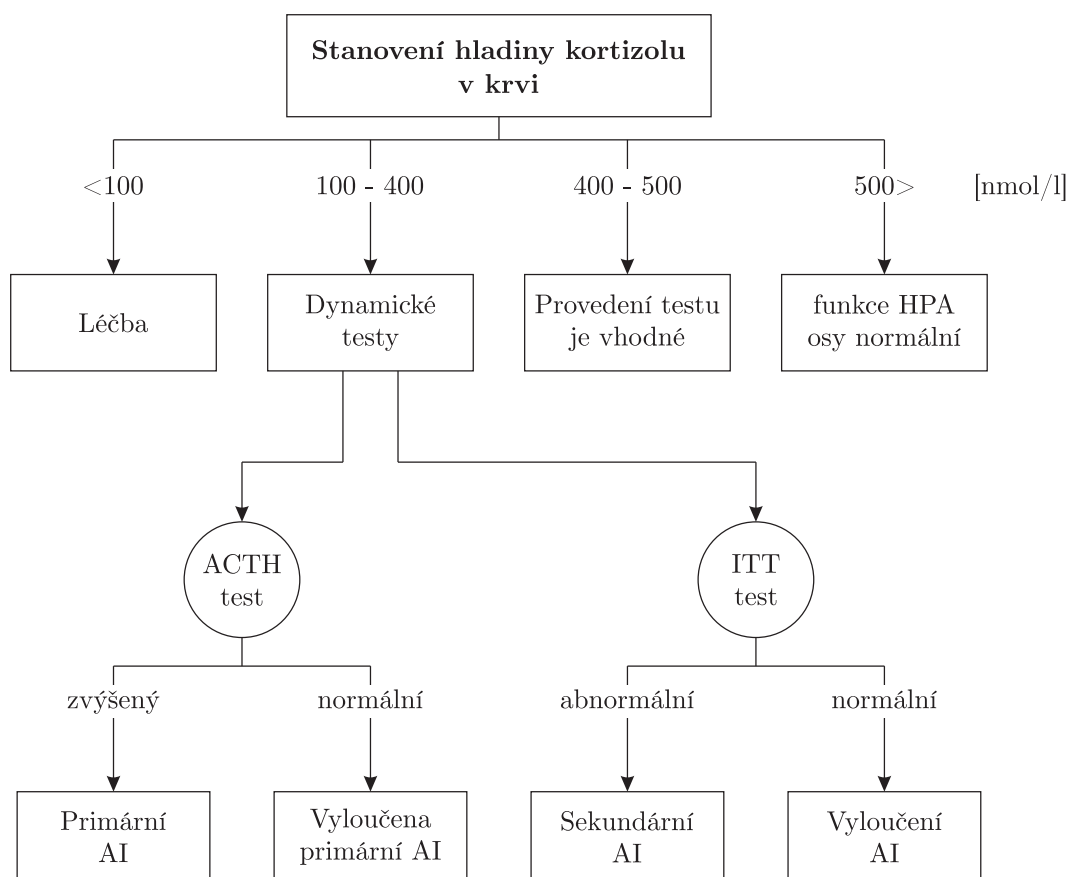
## 2.6 Imunoanalytické metody

Imunochemické metody nabízí jednoduché, rychlé a velice citlivé stanovení nízkých hladin hormonů, léčiv, drog, vitaminů nebo nádorových či kardiálních markerů. Ke stanovení těchto látek postačují malá množství biologických materiálů – krev, plazma, moč nebo sliny. Základem imunochemických metod je vysoce specifická reakce mezi antigenem a protilátkou [29].

Rychle se vyvíjející imunometody nahradily některé chromatografické techniky v klinické diagnostice, a to především díky rychlé detekci protilátek [29]. Naopak u některých analýz, jako je kvalitativní vyhodnocení neznámých vzorků se chromatografie stále využívá [30]. Především moderní spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) poskytuje obrovské zlepšení v citlivosti a specifičnosti analytického stanovení nejen steroidních hormonů [31, 32].

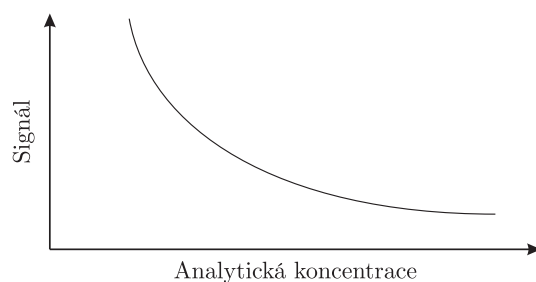
Imunoanalytická stanovení mohou být buď v kompetitivním nebo nekompeti-





Obrázek 2.9: Diagnostický postup při podezření na primární nebo sekundární AI

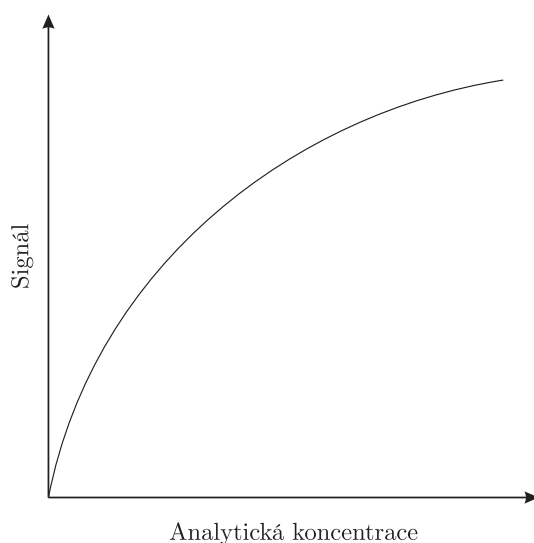
tivním uspořádání [30,32]. U kompetitivního typu stanovení soutěží antigen ze vzorku se stejným neznačeným antigenem ze soupravy o vazbu na omezený počet vazebných míst protilátek. Původní koncentrace stanovovaného analytu je nepřímo úměrná výšce signálu. Kalibrační křivka má v tomto případě tvar hyperboly (Obr. 2.10).



Obrázek 2.10: Kompetitivní uspořádání

Nekompetitivní stanovení se díky použití dvou protilátek také někdy označuje jako stanovení sendvičové, neboť antigen ze vzorku je vychytáván mezi dvě protilátky, které jsou v reakční směsi přítomny v nadbytku. Na rozdíl od kompetitivního

uspořádání zde platí přímá úměra mezi velikostí naměřeného signálu a koncentrací stanovovaného antigenu. Kalibrační křivka má tvar paraboly (Obr. 2.11).



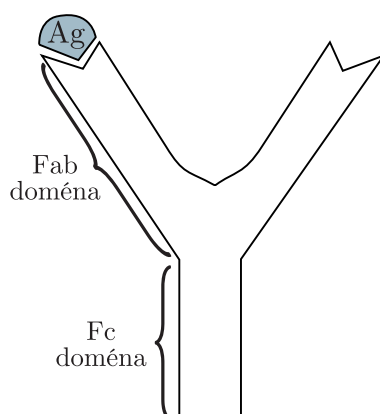
Obrázek 2.11: Nekompetitivní - sendvičové uspořádání

U imunochemických metod je možné provádět stanovení a detekci buď přímo v reakční směsi, čemuž odpovídá homogenní imunoanalýza nebo po separaci vzniklého imunokomplexu tedy heterogenní imunoanalýza.

Homogenní imunoanalýzy nevyžadují separaci volného a vázaného značeného reaktantu. Po vazbě na antigen nastává u některých metod změna aktivity značené molekuly [30]. Při této analýze dochází v jedné směsi k reakci a zároveň pak i k měření aktivity použité značky. Díky tomu je celý postup jednodušší a rychlejší [33]. Heterogenní imunoanalýzy vyžadují oddělení vázaného a volného značeného reaktantu. Separace je umožněna precipitací, odsátím zbytku reakční směsi pevně zakotvené protilátky, adhezí použitých částic, které jsou vázané na protilátku nebo magneticky [30].

Výběr protilátky může ovlivnit specifitu a senzitivitu imunochemického vyšetření [30]. Jedná se o protein ze třídy imunoglobulinů s charakteristickou strukturou a funkčními vlastnostmi [29]. Nejčastěji používaný je imunoglobulin typu G – IgG. Protilátky jsou tvořeny čtyřmi polypeptidy – dvěma těžkými a dvěma lehkými řetězci, které vytváří charakteristický tvar písmene „ypsilon“ (Obr. 2.12). Struktura obsahuje doménu Fab zodpovědnou za vazbu antigenu a doménu Fc, která je důležitá z hlediska funkce a regulace imunitního systému [29,34]. Protilátky jsou schopny se vázat na antigeny, specializované buňky nebo proteiny imunitního systému. Jsou

produkovány imunitním systémem jakéhokoli obratlovce nebo člověka v důsledku obranné reakce na cizí látku, antigen [29, 34].



Obrázek 2.12: Struktura protilátky

Mezi používané protilátky patří monoklonální a polyklonální protilátky. Získání polyklonálních protilátek je někdy neopakovatelné. Připravují se imunizací zvířete a jsou vždy směsí protilátek [34]. Polyklonální protilátky mají vyšší citlivost, než monoklonální, neboť jsou schopné rozeznat i izoformy antigenu [30]. Monoklonální jsou produkované hybridomy. Ty jsou připravovány fúzí imunizovaných slezinných buněk s nádorovými buňkami, které po purifikaci a izolaci produkují pouze jediný typ protilátky [30, 33, 34]. Použitím monoklonálních protilátek se dosahuje vyšší specifiity a je možné tyto protilátky produkovat kontinuálně. Antigeny se rozumí proteiny, nukleové kyseliny, sacharidy, lipidy nebo jejich kombinace [34]. Jsou to látky, které mohou vyvolat imunitní reakci u příslušného hostitele, jejímž produktem tedy protilátkou, mohou být rozpoznány. Epitop je specifická povrchová oblast antigenu, díky které je rozpoznán protilátkou a na kterou se poté protilátka váže. Antigen indukuje produkci protilátky a slouží jako jakýsi „zesilovací prvek“, jelikož samotný antigen a protilátka jsou přítomny ve velmi nízkých koncentracích [29, 35].

### 2.6.1 Radioimunometody

První immunoanalýza byla popsána v padesátých letech minulého století. V roce 1977 profesorka R. Yalow získala Nobelovu cenu za medicínu společně s doktorem S. Bersonem. Cena byla udělena za vyvinutí metody RIA (Radioimunoanalýza) pro inzulin [32, 35].

Radioimunoanalýza je běžně dostupná jak v kompetitivním uspořádání (RIA), tak v nekompetitivním (IRMA). Jedná se o vysoce citlivou a specifickou metodu,

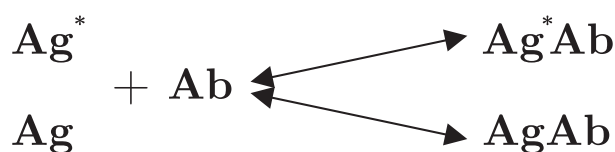
u které je možné přímo určovat koncentrace měřených látek. A to i v případě přítomnosti strukturně podobných látek, jejichž koncentrace je mnohonásobně vyšší [36]. Díky své vysoké citlivosti často předčí i mnohé automatizované neizotopové imunoanalýzy [30]. Tyto metody jsou také často nazývány radioizotopové metody, neboť je využíváno značení radioaktivním izotopem jodu  $^{125}\text{I}$ . Jedná se o  $\gamma$ -zářič, který nahradil dříve používané tritium  $3\text{H}$ - $\beta$ -zářič, neboť užití  $^{125}\text{I}$  je méně finančně náročné. Navíc se radioaktivní izotop vodíku již nevyrábí [37, 38]. Dalším důvodem je také kratší biologický poločas radiojodu, 60 dní [34, 39]. Stejně tak dnes již nepoužívaným radioaktivně značeným prvkem je  $^{57}\text{Co}$ .

V případě RIA je radioaktivním prvkem značen antigen. Antigen se váže na specifickou protilátku a nasycuje tak její vazebnou kapacitu. Proto se radioimunoanalytické metody řadí z hlediska metodiky rovněž k saturační analýze. Oproti tomu u IRMA je značena protilátka.

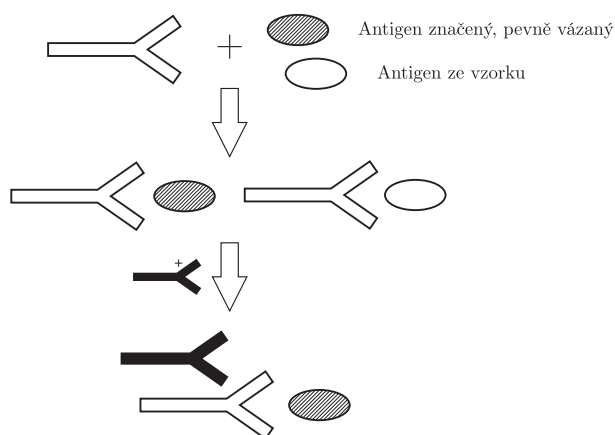
Radioimunoanalýza stejně tak jako většina imunoanalytických metod není standardizována. Jednotlivé soupravy pro stanovení určitého hormonu v séru či jiné tělesné tekutině pacienta nemusí poskytovat stejný výsledek. I přestože jsou založeny na stejném principu [15]. Proto je důležité provádět kontroly, kdy se pro každou sérii vytvoří kalibrační křivka a stanoví se hladiny kontrolních vzorků [35]. Vhodné je také používat stále stejnou komerční soupravu, neboť výsledek může být snadno zatížený chybou v důsledku přepočítávání výsledků z jedné soupravy na druhou [15].

## Princip RIA

Během reakce (Obr. 2.13) dochází ke kompetici konstantního množství značeného antigenu a různého množství neznačeného antigenu o vazebné místo na specifické protilátce, která je v reakci obsažena v omezeném množství. Stanovovanou látkou je zde antigen neznačený. Výsledkem reakce jsou dva komplexy a to značený antigen-protilátka a antigen – protilátka (Obr. 2.14). Přičemž množství značeného antigenu, který je navázaný na protilátku, je nepřímo úměrné množství neznačeného antigenu. Čím více je neznačeného antigenu, tím se naváže menší množství značeného antigenu na protilátku, tedy radioaktivita komplexu značený antigen – protilátka bude nižší.



Obrázek 2.13: Princip RIA



Obrázek 2.14: Kompetitivní reakce

Aby se mohl stanovit příslušný antigen touto metodou, je nutné použít větší množství značeného antigenu, než je vazebná kapacita protilátky. Té je do reakce přidáváno takové množství, aby došlo k navázání přibližně 50 % aktivity značeného antigenu.

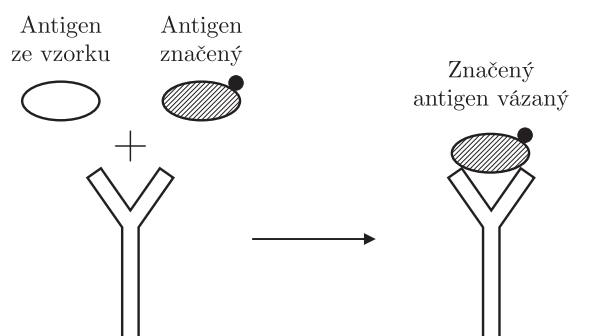
Značený antigen je v příslušném komplexu vázán na protilátku, kde je právě tato část protilátky nazývána jako vázaná frakce (B) z anglického „bound“. Volná část značeného antigenu se nazývá volná frakce (F) z anglického „free“. Po ustanovení rovnováhy jsou frakce odděleny a je měřena radioaktivita jedné z nich. Radioaktivita je mírou koncentrace neznačeného antigenu v měřeném vzorku [34].

## Princip IRMA

Imunoradiometrická analýza je nekompetitivní imunologická metoda in vitro. Na rozdíl od RIA má opačné uspořádání, kdy je specifická protilátka navázána na stěnu zkumavky proti stanovovanému antigenu.

Po přidání vzorku se stanovovaným antigenem dochází ke tvorbě primárního komplexu vázaná protilátka – stanovovaný antigen. Po inkubaci se přidá druhá radionuklidem značená protilátka, která se naváže na stávající komplex, čímž dojde k tvorbě sekundárního komplexu vázaná protilátka – stanovovaný antigen – značená protilátka. Poté, co jsou odstraněny zbytky značené protilátky, je měřena radioaktivita sekundárního komplexu. Na rozdíl od RIA zde platí přímá úměra mezi velikostí naměřeného signálu a koncentrací stanovovaného antigenu (Obr. 2.15)

U této metody může dojít k ovlivnění její specifity, neboť použitím přebytečného množství reagentů mohou reagovat strukturně podobné látky se značenou pro-



Obrázek 2.15: Nekompetitivní reakce

tilátkou stejně tak jako se stanovovanou látkou. Aby se tomuto problému předešlo, používají se zde právě dvě protilátky.

## 2.6.2 Detekce gama záření

Pro detekci  $\gamma$ -záření se nejčastěji používá scintilační studnový detektor, který je vhodný pro měření kapalin in vitro. Je tvořený scintilačním detektorem, který obsahuje krystal NaI(Tl). Krystal je zapouzdřen v hliníkovém obalu, jehož vnitřní stěny jsou pokryty MgO. Uprostřed krystalu je otvor pro zasunutí zkumavky, čímž je dosaženo lepší geometrické účinnosti měření. Celý přístroj je stíněný olověným krytem. Poté, co krystal absorbuje gama záření, začne vysílat záblesky viditelného světla. Ve fotonásobiči jsou pak světelné fotony přeměněny na tok elektronů. Na výstupu fotonásobiče je registrován světelný impuls. Impulzy jsou poté upravovány v předzesilovači, zesíleny v zesilovači a tříděny v analyzátoru impulsů. Nakonec jsou registrovány v čítači.

## 2.6.3 Další typy imunoanalytických metod

I když byl radioizotop použit jako první značka a jedná se o jeden z nejvíce citlivých detekčních systémů používaných v imunochemii, existuje celá řada dalších značek (enzymy, fluorofory), které umožňují osvobození od technických a bezpečnostních nevýhod radioizotopů. Obecně však nemají takovou senzitivitu [33].

### Enzymová imunoanalýza

Zde se jako značka využívá enzym. Nejvíce aplikovanými enzymy jsou křenová peroxidáza,  $\beta$ -galaktozidáza, alkalická fosfatáza, glukóza-6-fosfát dehydrogenáza, acetylcholinesteráza a další [29, 40]. Tyto značky jsou nejčastěji měřeny spektroskopii ve VIS nebo UV oblasti. V některých případech lze kvalitativní stanovení provést

pouhým okem. V procesu EIA (Enzymová Imunoanalýza) molekuly enzymů konjugují se sekundárními protilátkami, které se váží na primární komplex antigen – protilátka. Po přidání vhodného substrátu enzym katalyzuje tvorbu konečného barevného produktu, který může být vizualizován a kvantifikován. Na produktu konečné enzymatické reakce je závislé měření signálu [30].

Většina komerčně dostupných EIA systémů vyžaduje separaci imunokomplexů [29]. Příkladem je ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), heterogenní imunoanalýza, která je velice oblíbená a nenáročná na používanou techniku. Je dostupná jak v kompetitivním, tak v sendvičovém uspořádání. Separace je dosaženo vazbou antigenu nebo zachycením protilátky na pevném nosiči jako je polystyrenová mikrotitrační destička, latexové či magnetické kuličky [29].

První homogenní imunoanalýzou byla metodika EMIT (Enzyme Multiplied Immunoassay Technique) [33]. Slouží hlavně ke stanovení léků v krvi či drog v moči [29, 40]. Princip je založen na kompetici léku ze vzorku s lékem, který je značený glukóza-6-fosfátdehydrogenázou o vazbu na protilátku [30]. Navázáním na protilátku dojde k poklesu aktivity enzymu. Spektrofotometrická detekce je umožněna přechodem  $\text{NAD}^+$  na NADH, za který je zodpovědný aktivní enzym. Výhodou homogenních EIA je jejich vysoká rychlost a také velké množství komerčně dostupných testů. Nevýhodou pak nižší citlivost a vyšší cena přístrojového vybavení a provozních nákladů [40].

## Fluorescenční imunoanalýza

Fluoroimunoanalýza je založena na měření fluorescence. Ke značení se zde používají fluorescenční barviva – fluorofory. Ty mohou být vizualizovány fluorescenčním mikroskopem, fluorometrem či průtokovým cytometrem [29]. Nejběžněji používaným fluoroforem je fluorescein. Citlivost této metody je srovnatelná s metodou EIA [34].

Zásadní přínos pro měření fluorescence přinesl systém DELFIA (Dissociation-enhanced Lanthanide Fluoroimmunoassay). Protilátky jsou zde značeny lanthanidovými cheláty, jako je europium, samarium, terbium či thulium s velice dlouhou fluorescencí [41]. Tento systém umožňuje v reakční směsi detekovat koncentrace až  $10^{-17}$  mol/l. Uvolněním iontů do prostředí dojde k zesílení fluorescence, jejíž životnost je mnohonásobně delší než u běžné fluorescence [30]. Toho se využívá k měření.

Fluorescenční imunoanalýza zahrnuje jak heterogenní, tak homogenní uspořádání. Heterogenní je založené na vazbě značeného antigenu a vzorku séra na polyakrylamidové kuličky, na nichž je navázaná specifická protilátka, a následném měření

fluorescence. TRACE (Time resolved Amplified Cryptate Emission) je příkladem nejpokročilejší technologie homogenní imunoanalýzy. Typickými fluorescenčními indikátory jsou zde kryptáty vzácných zemin [42]. Jsou to indikátory s velice dlouhou fluorescencí, čímž je umožněno použít časově modulované detekce fluorescence. Kryptáty jsou tvořeny iontem  $\text{Eu}^{3+}$  obsaženým v intramolekulární dutině makropolycyklického ligandu, který obsahuje bypiridinové absorpční skupiny. Kryptáty slouží ke značení antigenů nebo protilátek, vždy podle typu stanovení. Druhá protilátka je značena fluoroforem – akceptorem, nejčastěji alofykocyaninem. Po inkubaci je možné imunokomplex excitovat světlem vlnové délky 337 nm. Zesílená energie je přenesena z kryptátu, tedy donoru na fluofofor, a je detekována při 665 nm jako časově prodloužený signál [30, 42]. Akceptor nevázaný v imunokomplexu není excitován a tím tedy nedochází k interferenci měření. Jedná se o velice přesnou metodu, jejíž výsledky mají vysokou reprodukovatelnost v čase i v sérii.

### **Luminiscenční imunoanalýza**

Imunoanalytické metody založené na chemiluminiscenci mají podstatně vyšší citlivost a dynamický rozsah oproti jiným neradioaktivním metodám [43]. Efektivní emise světla s nízkým pozadím je spojena s vysokou citlivostí a širokým rozsahem detektoru (fotonásobiče).

Antigeny nebo protilátky jsou zde značeny luminofory, jejichž rozpadem v alkalickém prostředí v důsledku působení peroxidu vodíku dochází k uvolnění světelného kvanta. Typickým chemiluminoforem je zde akridinový ester [43]. Je velice stabilní a v biologických materiálech neinterferuje. Jinými značkami jsou například luminol, isoluminol a jeho deriváty. Chemiluminiscenční imunoanalýza se stala velice populární v klinických laboratořích, kde jsou analyzována velká množství vzorků. Právě k jejich stanovení se využívají velké analyzátory s chemiluminiscenční detekcí. Tyto samostatné jednotky zahrnují dávkování vzorků a reagensů, inkubaci, detekci a automaticky vyhodnocují výsledky [30, 33]. Jedná se o uzavřený analytický systém, který je určený k neustálému provozu. Oproti metodám RIA či ELISA, které jsou vyvíjeny velice rychle, je pro firmy uvedení analyzátoru na trh velice časově a finančně náročné. I když je cena vyšetření na analyzátoru vyšší, vyváží se nižšími náklady na opakované kalibrace.

### **Multiplexová imunoanalýza**

Multiplexová imunoanalýza je moderní analytický postup umožňující stanovení hladin mnoha různých proteinů v jednom vzorku o objemu řádu desítek mikro-



litřů [30]. Základem je vazba antigenu na značenou protilátku na povrchu barevně značených kuliček nebo je možné použít mikrotitrační destičky, kde jsou v jamkách imobilizovány značené protilátky.

Tradiční metodika ELISA je používána ve vědě, výzkumu a k diagnostice nej-různějších chorob několik let. Multiplexní nebo také Mozaic ELISA nabízí stejnou spolehlivost a citlivost a dovoluje testování více analytů v jednom patientském vzorku současně [44]. Tím se minimalizují náklady, čas i používaný objem vzorku. Současně lze měřit až 25 odlišných analytů v každé jamce 96-jamkové destičky [30, 34, 44]. To je umožněno díky navázaným protilátkám v každé jamce. Po na-pipetování standardů a vzorků do jamek se na tyto imobilizované protilátky váží sledované analyty. Ve všech jamkách je obsažen referenční bod, díky němuž jsou vizualizovány silně pozitivní jamky [30]. Mosaic ELISA částečně přijala charakter luminiscenčního/chemiluminiscenčního systému, neboť enzymatické značky jsou v tomto případě chemicky nekompatibilní pro simultánní analýzu několika lokalizovaných cílů [44]. K detekci navázaných analytů se používá směs biotinylovaných detekčních protilátek a Streptavidin-HRP [30]. Chemiluminiscenční značka uvolňuje světelný signál. Ten odpovídá množství navázaného analytu. Každé místo v jamce emituje světlo, jehož intenzita je vyhodnocena digitálním zobrazovacím systémem.

## 3 Experimentální část

### 3.1 Metodika

#### 3.1.1 Princip stanovení kortizolu

Sérový i slinný kortizol se stanovuje kompetitivní imunoanalýzou, která využívá přímou chemiluminiscenční technologii. Analýza biologického materiálu probíhá na analyzátoru ADVIA: Centaur od firmy Siemens. Kortizol ze vzorku soutěží s kortizolem, který je značený akridinovým esterem o vazbu na polyklonální králičí protilátku proti kortizolu, která je kovalentně vázána na paramagnetické částice. Vzniklé komplexy antigen (kortizol ze vzorku nebo kortizol značený)- protilátka se po inkubaci separují magneticky. V alkalickém prostředí dochází působením  $H_2O_2$  k rozpadu akridinového esteru a vzniká chemiluminiscenční signál, který je detekován. Mezi množstvím kortizolu přítomným ve vzorku od pacienta a množstvím relativních světelných jednotek (RLU) detekovaných systémem existuje nepřímá úměra.

#### Reagencie

Tento analyzátor využívá ke stanovení vlastní reagencie soupravy Centaur Cortisol. Reagencie jsou v kazetách se dvěma typy roztoků:

- a) Reagencie Lite – kortizol označený akridinovým esterem v pufrovaném fyziologickém roztoku se salicylátem sodným, 0,1% azidem sodným a konzervačními látkami; (2,5 ml).
- b) Solid Phase – králičí protilátka proti kortizolu vázaná na monoklonální myší antikráličí IgG protilátku kovalentně vázaná na paramagnetické částice v pufru a 0,1% azidem sodným a konzervačními látkami Stabilita do uplynutí data expirace nebo 28 dní po prvním použití ve stroji
- c) Multi Diluent 3 – ředící roztok s lidskou plazmou a azidem sodným 0,1%; (5 ml).

Všechny reagencie jsou připravené k okamžitému použití.

Reagencie nutné k provedení analýzy, které již nejsou součástí diagnostické soupravy Centaur Cortisol:

- **Kalibrátor E** – lyofilizovaný kalibrátor, který se rozpouští v 5 ml redestilované vody. Je určený k ověření správnosti kalibrační křivky, která je přiložena ke každé soupravě ke stanovení kortizolu. Kalibrace se provádí minimálně každých 28 dní a vždy při změně šarže reagentů;

- a) Low kalibrátor – nižší hladina
- b) High kalibrátor – vyšší hladina

Do použití se skladuje při 2 – 8 °C. Stabilita do expirace nebo 28 dní po rekonstrukci. V analyzátoru je stabilita 4 hodiny.

- **ADVIA: Centaur Acid/base** – Pomocné roztoky pro chemiluminiscenční detekci.

- a) Acid obsahuje peroxid vodíku a malé množství kyseliny dusičné
- b) Base obsahuje roztok hydroxidu sodného s detergentem

Stabilita do expirace.

## Přístroj

Stanovení sérového a slinného kortizolu bylo provedeno na analyzátoru ADVIA:Centaur firmy Siemens (Obr. 3.1). Systém měření je založený na detekci chemiluminiscence. Analyzátor představuje uzavřenou jednotku, která samostatně dává vzorky i reagensie, má vlastní inkubační systém, detekci a automaticky vyhodnocuje výsledky. Reagensie uložené uvnitř mají vlastní chlazený prostor. Analyzátor je uzpůsobený k nepřetržitému provozu. Stanovení kortizolu: Pro jedno stanovení pipetuje analyzátor 20  $\mu$ l vzorku, mrtvý objem je minimálně dalších 100  $\mu$ l. Do reagenční kyvety se dále přidá 50  $\mu$ l Lite Reagent a 250  $\mu$ l reagensie s monoklonální protilátkou vázanou na paramagnetické částice. Poté probíhá inkubace po dobu 5 minut při 37 °C. Dalším krokem je separace komplexu, odsátí veškeré kapaliny, promytí a další odsátí. Před konečnou detekční reakcí se přidá peroxid vodíku a přímo v luminometru se přidává roztok hydroxidu sodného. Tím dojde k rozpadu akridinového esteru a vyzáření světelného kvanta. Velikost světelného signálu je nepřímo úměrná původní koncentraci kortizolu ve vzorku, která je odečtena z uložené kalibrační křivky v softwaru analyzátoru.

### 3.1.2 Princip stanovení CBG

Kvantitativní stanovení CBG se provádí za použití kompetitivní radioimunoanalýzy. CBG ze vzorku soutěží s CBG značeným  $^{125}\text{I}$  o vazbu na myší anti-CBG protilátku, která je imobilizovaná na stěně polystyrenové zkumavky. Po inkubaci vzorku při pokojové teplotě následuje krok ukončující kompetitivní reakci – odsátí



Obrázek 3.1: Analyzátor ADVIA: Centaur [45].

reakční směsi. Po promytí pracovním roztokem se obsah zkumavek opět odsaje. Radioaktivita je měřena na gama čítači. Koncentrace CBG ve vzorku je zjištěna z kalibrační závislosti, kde mezi množstvím radioaktivity a koncentrací vazebného proteinu ve vzorku platí nepřímá úměra.

## Reagencie

Stanovení koncentrace CBG bylo provedeno pomocí komerční soupravy od firmy DRG Diagnostics, DE, která zahrnuje následující materiály a reagenty:

- **Zkumavky** – polystyrenové zkumavky s navázanými kozími anti myšími protilátkami připravené k okamžitému použití; (2x48).
- **Ag 125J** –  $^{125}\text{I}$  značený tracer CBG ve fosfátovém pufru s BSA (hovězí sérový albumin) a s 0,1% azidem sodným připravený k okamžitému použití; (10,5 ml, 89 kBq).
- **Cal 0** – Lahvička lyofilizovaného kalibrátoru ve fosfátovém pufru s BSA a 0,1% azidem sodným, který se rozpouští ve 3 ml redestilované vody. Slouží jako blank; (1x).
- **Cal N** – Lahvičky lyofilizovaných kalibrátorů ve fosfátovém pufru s BSA a 0,1% azidem sodným, který se rozpouští v 1 ml redestilované vody. Používají se jako standardy ke kalibraci CBG; (6x).
- **Antiserum** – CBG antiserum ve fosfátovém pufru s BSA a 0,1% azidem sodným připravené k okamžitému použití; (10,5 ml).
- **DIL BUF** – fosfátový pufr s BSA a 0,1% azidem sodným určený k ředění vzorků, připravený k okamžitému použití; (110 ml).
- **Wash Solution** – Promývací roztok Tris HCl, který se ředí 70x s redestilovanou vodou; (10 ml).

- **Control** – Lyofilizované kontrolní vzorky fosfátového pufru s lidským sérem, BSA a 0,1% azidem sodným, které se rozpouští v 0,5 ml redestilované vody; (2x).

Do použití se skladuje při 2 – 8 °C.

Stabilita do expirace nebo 7 dní po prvním otevření reagensů. Rozpuštěné kalibrátory se pro další použití alikvotují a skladují do data expirace v alikvotech při teplotě minimálně -20 °C.

## Stanovení

Ke stanovení bylo použito 63 vzorků séra. Stanovení bylo provedeno jedenkrát. Do příslušných zkumavek potažených specifickou protilátkou byly napipetovány re-agencie podle Tab. 3.1. Obsah všech zkumavek byl promíchán na vortexu. Poté byly všechny zkumavky inkubovány po dobu 2 hodin za stálého třepání, 400 rpm (otáčky za minutu) při pokojové teplotě (18 – 25 °C). Po ukončení inkubace došlo k odsátí obsahu každé zkumavky kromě zkumavek  $T_I, T_{II}$ . Zkumavky s označením  $T_I, T_{II}$  slouží k proměření celkové, tedy totální aktivity. Prázdné zkumavky s navázaným komplexem na stěně byly propláchnuty 2 ml promývacího roztoku, aby došlo k odstranění nenavázané značené protilátky. Poté se supernatant opět odsál. I v tomto případě nedošlo k promytí zkumavek  $T_I, T_{II}$ . Nakonec došlo k proměření všech zkumavek na gama čítači po dobu 60 sekund. Následovalo odečtení koncentrací z kalibrační křivky, která je součástí každé série vyšetření a je tvořena kalibrátorem 0, kalibrátory 1 – 6 a kontrolními vzorky o známé koncentraci.

## Přístroj

Pro stanovení CBG v séru byl použit gama čítač od firmy BERTHOLD Multi-Crystal Gamma Counter LB – 2111 (Obr. 3.2). Kompaktní, robustní, snadno použitelný gama čítač, který slouží k detekci radionuklidu jodu  $^{125}\text{I}$ . Je schopen pracovat buď v samostatném režimu, nebo může být připojen k počítači. Je tvořen 12 detektory, které jsou tvořeny krystalem NaI. Krystal absorbuje gama záření a umožňuje výbornou geometrii měření umístěných zkumavek se vzorkem. Energetický rozsah krystalu je do 500 keV a jsou vhodné pro běžné izotopy jako je  $^{125}\text{I}$ ,  $^{57}\text{Co}$ ,  $^{59}\text{Fe}$ ,  $^{51}\text{Cr}$  and  $^{99}\text{Tc}$ . Olovené, 12mm stínění zabraňuje rušení měření jednotlivých vzorků. Součástí je 12 stojanů, do kterých je možné naskládat vzorky a současně je měřit.

Tabulka 3.1: Příslušné objemy pipetované do zkumavek.

**Legenda:** Do 63 potahovaných zkumavek bylo napipetováno 50  $\mu\text{l}$  séra a 1,2  $\mu\text{l}$  fosfátového pufru. Dvě zkumavky byly označeny jako K I a K II, do kterých bylo napipetováno 100  $\mu\text{l}$  roztoku kontroly. 100  $\mu\text{l}$  příslušného kalibrátoru bylo postupně napipetováno do zkumavek Kal 1 – 6 a 100  $\mu\text{l}$  kalibrátoru 0 bylo napipetováno do zkumavek s označením Kal 0. Do všech těchto zkumavek bylo následně přidáno 100  $\mu\text{l}$  traceru a antiséra. Dvě zkumavky, nepotažené specifickou portilátkou byly použity ke stanovení totalu, do kterého bylo napipetováno pouze 100  $\mu\text{l}$  traceru.

Označení zkumavky	Sérum Kontrola [ $\mu\text{l}$ ] Kalibrátor	Pufr [ $\mu\text{l}$ ]	Tracer [ $\mu\text{l}$ ]	Antisérum [ $\mu\text{l}$ ]
Vz. 1 – 63	50	1,2	100	100
K I – II	100		100	100
Kal 1 – 6	100		100	100
Kal 0	100		100	100
$T_I$ , $T_{II}$			100	



Obrázek 3.2: Berthold Multi-Crystal Gamma counter LB - 2111 [46]

Spotřební materiál a laboratorní vybavení potřebné k provedení analytického postupu:

- Destilovaná voda
- Pipety s nastavitelným objemem a špičky na jedno použití
- Stojánek na zkumavky
- Vortex
- Třepačka (400 rpm)

- Odsávací systém

### 3.1.3 Princip stanovení reninu

Kvantitativní stanovení hladiny (hmotnostní koncentrace) aktivní formy reninu v plazmě in vitro prostřednictvím metody IRMA. V soupravě jsou použity myší monoklonální protilátky proti dvěma epitopům molekuly reninu. Jedná se o protilátky s vysokou aviditou, specificitou a komplementaritou. První monoklonální protilátka je ukotvena na stěnu polystyrenové zkumavky a rozpoznává jak aktivní, tak neaktivní formu reninu. Druhá monoklonální protilátka je značena jodem  $^{125}\text{I}$  a rozpoznává jen aktivní formu reninu. Vázaná aktivita  $^{125}\text{I}$  se měří na gama počítací 1 min. Koncentrace reninu ve vzorcích je přímo úměrná změřené radioaktivitě a získá se interpolací z kalibrační křivky pěti kalibrátorů.

#### Reagencie

Stanovení koncentrace reninu bylo provedeno pomocí komerční soupravy firmy Cisbio,FR, která obsahuje následující materiály a reagencie:

- **Zkumavky** – Na stěnách zkumavek jsou navázané myší monoklonální protilátky proti reninu připravené k okamžitému použití; (2x50).
- **Anti-Renin 125I** – Myší monoklonální renin protilátka značená 125I v pufru Tris (pH = 7,9), obsahující koňské sérum a 0,1% azid sodný, připravená k okamžitému použití; (11 ml, 360 kBq).
- **Cal 0** – Neboli blank obsahuje fosfátový pufr (pH = 7,4), kasein, barvivo a 0,1% azid sodný připravený k okamžitému použití; (7 ml).
- **Cal N** – Lahvičky lyofilizovaných kalibrátorů připravené ke kalibraci reninu. Sada standardů obsahující aktivní renin ředěný S0 obsahující 0,1% azid sodný. Před použitím se musí zředit 3 ml redestilované vody. Po úplném zředění musí být kalibrátor homogenizován; (3 ml, 5x).
- **Control** – Lyofilizované kontrolní vzorky určené ke kontrole měřených vzorků séra. Obsahuje lidskou plazmu s 0,1% azidem sodným. Před použitím je nutné vzorky kontrol zředit 2 ml redestilované vody; (2 ml).
- **Wash solution** – Promývací roztok imidazolového pufru (pH = 7,4) s obsahem polysorbátu 20 a azidu sodného 0,1% připravený k rozpuštění v 975 ml redestilované vody. Před použitím je nutné roztok promíchat; (25 ml).

Do použití se skladuje při  $2 - 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Rozpuštěné kalibrátory pro další použití alikvotujeme a skladujeme do data expirace v alikvotech při teplotě minimálně  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## Stanovení

Ke stanovení bylo použito 54 plazmatických vzorků. Stanovení bylo provedeno jen jedenkrát. Do příslušných zkumavek potažených specifickou protilátkou byly napipetovány reagentie podle Tab. 3.2. Zkumavky s připravenými reagentiemi byly promíchány na vortexu. Následná inkubace probíhala 3 hodiny za současného třepání při pokojové teplotě ( $18 - 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Po odsátí radioaktivního supernatantu byly zkumavky propláchnuty 2 ml promývacího roztoku a poté se obsah zkumavek opět odsál. Obsah zkumavek  $T_I$  a  $T_{II}$  se neodsával, ani neproplachoval, neboť slouží k naměření celkové aktivity. Měření radioaktivity probíhalo na gama čítači po dobu 1 minuty. Koncentrace reninu ve vzorcích je přímo úměrná změřené radioaktivitě a získá se interpolací z kalibrační křivky pěti kalibrátorů.

Tabulka 3.2: Příslušné objemy pipetované do zkumavek.

**Legenda:** Do 54 zkumavek potažených monoklonální myší protilátkou bylo postupně napipetováno  $300\text{ }\mu\text{l}$  vzorku plazmy. Do dalších dvou zkumavek s označením K I a K II bylo napipetováno  $300\text{ }\mu\text{l}$  příslušného roztoku kontroly a stejné množství kalibrátoru 0 bylo napipetováno do zkumavek s označením Kal 0. Do šesti zkumavek s označením Kal 1 – Kal 5 byly napipetovány kalibrační roztoky v množství  $300\text{ }\mu\text{l}$ . Do každé z těchto zkumavek pak bylo přidáno  $100\text{ }\mu\text{l}$  traceru značeného  $^{125}\text{I}$ .  $T_I$  a  $T_{II}$  zkumavky bez imobilizované protilátky obsahovaly jen  $100\text{ }\mu\text{l}$  monoklonální protilátky značené  $^{125}\text{I}$ .

Označení zkumavky	Plazma Kontrola [ $\mu\text{l}$ ] Kalibrátor	Tracer [ $\mu\text{l}$ ]
Vz. 1 – 54	300	100
K I – II	300	100
Kal 0	300	100
Kal 1 – 5	300	100
$T_I$ , $T_{II}$		100

### 3.1.4 Princip stanovení aldosteronu

Přímé kvantitativní stanovení aldosteronu in vitro metodou RIA. Princip metody je založen na soutěži aldosteronu ze vzorku biologického materiálu (plazmy)



s aldosteronem značeným  $^{125}\text{I}$  o omezený počet vazebných míst specifické protilátky. Reakce probíhá ve zkumavkách potažených protilátkou proti aldosteronu. Radioaktivita  $^{125}\text{I}$  se poté měří na gama-čítači 1 min. Z kalibrační křivky se odečítají koncentrace aldosteronu ve vzorcích. Mezi naměřenou aktivitou a koncentrací aldosteronu platí nepřímá úměra.

## Reagencie

Stanovení koncentrace aldosteronu bylo provedeno pomocí komerční soupravy firmy BeckmanCoulter, která obsahovala následující materiály a reagencie:

- **Zkumavky** – potažené protilátkou proti aldosteronu připravené k okamžitému použití; (2x50).
- **Anti-Aldosteron 125I** – Lyofilizovaný jodovaný aldosteron v pufru, obsahuje lidské sérum a barviva; (55 ml).
- **Cal 0** – Obsahuje lyofilizovaný aldosteron v lidském séru s 0,1% azidem sodným.
- **Cal N** – Lyofilizované standardy aldosteronu v lidském séru s 0,1% azidem sodným, celkem 5 hladin.
- **Control** – Lyofilizát aldosteronu v lidském séru s 0,1% azidem sodným.

Do použití se skladuje při 2 – 8 °C.

Stabilita do expirace nebo 10 dní po prvním otevření.

## Stanovení

Ke stanovení bylo použito 50 vzorků sér. Stanovení bylo provedeno jedenkrát. Do příslušných zkumavek potažených specifickou protilátkou byly napipetovány reagencie podle Tab. 3.3. Po napipetování reaglií do zkumavek byly promíchány jejich obsahy na vortexu. Neznámé vzorky, kontrolní vzorky a kalibrátory se spolu s  $^{125}\text{I}$  – aldosteronem inkubovaly ve zkumavkách za stálého třepání (350 rpm) a při pokojové teplotě (18 – 25 °C). Po inkubaci se obsahy zkumavek odsály a navázaná aktivita byla měřena gama čítačem po dobu 1 minuty. Celkový počet impulzů byl stanoven z obsahu zkumavek označených  $T_I$  a  $T_{II}$ . Po sestrojení kalibrační křivky z ní byly odečteny koncentrace aldosteronu v neznámých vzorcích.

Tabulka 3.3: Příslušné objemy pipetované do zkumavek.

**Legenda:** Do 50 zkumavek potažených specifickou protilátkou bylo postupně napipetováno 50  $\mu\text{l}$  vzorku séra. Do dvou zkumavek označených K I a K II bylo napipetováno 50  $\mu\text{l}$  roztoku kontrol. Kalibrátory byly napipetovány do příslušných zkumavek s označením Kal 0 a Kal 1 – 6 po 50  $\mu\text{l}$ . Do všech zkumavek bylo napipetováno 500  $\mu\text{l}$  traceru. Do nepotažených zkumavek s označením  $T_I$  a  $T_{II}$  bylo napipetováno pouze 500  $\mu\text{l}$  jodovaného aldosteronu.

Označení zkumavky	Plazma Kontrola [ $\mu\text{l}$ ] Kalibrátor	Tracer [ $\mu\text{l}$ ]
Vz. 1 – 50	50	500
K I – II	50	500
Kal 0	50	500
Kal 1 – 5	50	500
$T_I$ , $T_{II}$		500

## Přístroj

Pro stanovení reninu a aldosteronu v plazmě byl použit analyzátor STRATEC SR 300 od firmy Stratec (Obr. 3.3). Plně automatizovaný přístroj založený na měření radioaktivity v příslušném vzorku. Analyzátor obsahuje vlastní pipetovací jednotku, inkubátor, promývací a měřicí systém. Umožňuje měření až 180 vzorků za hodinu a výsledky jsou k dispozici již po pěti minutách od ukončení inkubace. Měřicí systém se skládá z pěti samostatných detektorů a zahrnuje integrovaný počítač s vlastním operačním systémem pro výpočet koncentrací vzorků.



Obrázek 3.3: Stratec Sr 300 [47]

### 3.1.5 Stanovení ACTH

Stanovení ACTH v séru bylo provedeno v laboratoři endokrinologie a metabolismu (ÚLBD VFN 1. LF UK).

### 3.1.6 Provedení zátěžových testů

Veškeré zátěžové testy byly provedeny odborným lékařským personálem na endokrinologickém oddělení III. interní kliniky VFN a 1. LF UK v Praze na Karlově náměstí. Inzulinový test byl prováděn ve stacionárních podmínkách u 58 probandů. Po celou dobu testu byla zajištěna průběžná kontrola a veden písemný protokol o průběhu. V předvečer testu zůstal pacient na lačno, byla mu dovolena jen voda na pití. Inzulinový test byl prováděn v ranních hodinách, kdy byla nejprve stanovena bazální hladina sérového kortizolu (0. minuta). Poté byla pacientovi podána intravenózně injekce bolusu humánního inzulinu v množství vztaženém na kilogram tělesné váhy. Další odběry krve následovaly po 20, 30, 40, 60, 90 a 120 minutách. U každého z pacientů byl zaznamenán věk a index tělesné hmotnosti (BMI). V těchto vzorcích krve byl stanoven kortizol a ACTH. Pokud to bylo možné, byly dobrovolníkům zároveň s krví odebírány i sliny.

Stejnému souboru kontrolních zdravých osob, kterému byla vyvolána extrémní hypoglykémie v důsledku ITT, byly provedeny i dynamické synacthenové testy – LDST, MDST a HDST. Pacient musel být vždy na lačno a ženy musely před testy vysadit HAK.

Každý test byl prováděn v jiný den. Před začátkem příslušného testu byla vždy pacientovi zavedena kanyla do žíly. První odběr krve byl proveden po půl hodině ležení v klidu. Aby se vyloučil stres, což je hlavně důležité u kortizolu, byly všechny bazální odběry provedeny najednou. Tedy odběr pro zjištění bazální hladiny kortizolu, CBG, aldosteronu i reninu.

Při provedení LDST se pacientovi podala intravenózně vleže dávka  $1\mu\text{g}$  syntetického ACTH<sup>1–24</sup>. K odběru krve poté došlo po 20., 30., 40. a 60. minutě. Dále byl prováděn MDST (Medium-dose Short Synacthen Test). Pacientovi byla vleže injikována ampule  $10\mu\text{g}$  synacthenu. Následovaly odběry krve po 30, 60 a 90 minutách po injekci. Během HDST se intravenózně do žíly aplikovala dávka  $250\mu\text{g}$  syntetického ACTH<sup>1–24</sup>. Krev byla odebrána ve 30., 60. a 90. minutě po injekci. Pokud to bylo možné, s odběrem krve probíhal vždy i odběr slinného vzorku, ve kterém byla stanovena hladina kortizolu v příslušných minutách.

## 3.2 Analytické parametry použitých metod

Každá metoda je definována několika analytickými parametry, které slouží k vyhodnocení správnosti a vhodnosti takového stanovení.

- **Opakovatelnost**

Preciznost měření ze souboru podmínek opakovatelnosti měření.

Podmínka opakovatelnosti měření zahrnuje stejný postup měření, stejný obslužný personál, stejný měřicí systém, stejné pracovní podmínky a stejné místo, a opakování měření na stejném objektu v krátkém časovém úseku. Opakovatelnost je vlastnost metody, nikoli výsledku [48].

- **Mezilehlá preciznost**

Preciznost měření za souboru podmínek mezilehlé preciznosti měření.

Podmínka mezilehlé preciznosti měření zahrnuje stejný postup měření, stejné místo a opakování měření na stejném nebo podobných objektech v rozšířeném časovém úseku [48].

- **Zpětná výtěžnost (Recovery)**

Výtěžnost je podíl rozdílu mezi údaji měřicího systému při měření vzorku se známým množstvím přidaného analytu nebo složky a vzorku bez přídavku a přidaného množství [48].

- **Nejistota**

Nejistota je parametr přidružený ke každému výsledku měření, který vyjadřuje jak omezené, tak praktické omezené možnosti procesu měření. Absolutně přesný výsledek měření neexistuje. Přítomnost nejistoty u imunoanalytické metody znamená, že výsledek měření není pouze jedna hodnota, ale interval hodnot. Tedy oblast, ve které se výsledek měření nachází s určitou pravděpodobností. Odhad nejistoty měření lze vyjádřit jako variační koeficient souboru dlouhodobého sledování jedné hladiny analytu.

### 3.2.1 Analytické parametry stanovení kortizolu

Stanovení kortizolu je akreditovaná metoda podle ISO 15189. Každý rok je prováděna verifikace metody, aby se ověřila její vhodnost pro další použití v příslušné laboratoři (viz Příloha A).

Nejistota stanovení kortizolu byla stanovena laboratoří ÚLBD VFN 1. LF UK. Pro všechny hladiny kortizolu je standardní nejistota menší než 9,5 %.

**Další parametry byly stanoveny výrobcem a jsou součástí příbalového letáku.**

- **Specifita**

Stanovení ADVIA Centaur CP Cortisol je vysoce specifické pro kortizol. (Zkřížená reaktivita strukturně podobných sloučenin a léků byla stanovena standardním přidavkem každé látky do vzorku lidského séra do konečné hladiny 27,590 nmol/l).

- **Citlivost a rozsah metody**

Stanovení ADVIA Centaur CP Cortisol měří kortizol v séru do koncentrace 2069 nmol/l s mezí detekce (analytická citlivost) 5,5 nmol/l. Analytická citlivost je definována jako koncentrace kortizolu, která je o dvojnásobek standardní odchylky nižší než střední hodnota RLU 20 replikátů nulového standardu pro kortizol.

- **Linerita**

Pět vzorků lidských sér v rozsahu od 1468,0 do 1956,0 nmol/l kortizolu bylo zředěno 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 Multi-Diluentem 3 a měřeno na linearitu a paralelnost. Odezva byla v rozsahu 94,2 % do 110,2 % s průměrem 102,6 %.

- **Zpětná výtěžnost**

Do sedmi vzorků s kortizolem s přirozenou hladinou od 130,2 do 266,0 nmol/l bylo přidáno různé množství kortizolu. Odezva byla v rozsahu 84,8 % do 113,0 % s průměrem 99,4 %.

- **Přesnost**

Tři vzorky byly čtyřikrát proměřeny ve 20 stanoveních na 2 analyzátorech (n=160 pro každý vzorek) po dobu 10 dní.

- **Standardizace**

Stanovení ADVIA Centaur Cortisol je analyticky standardizováno s použitím vnitřního standardu a ověřeno plynovou chromatografií s hmotnostní spektroskopií (GC-MS). Hodnoty kalibrátoru mají návaznost na tuto standardizaci.

### 3.2.2 Analytické parametry stanovení aldosteronu

Metoda stanovení aldosteronu je akreditována podle normy ISO 15 189/2013 a každý rok je provedena verifikace metody, aby se ověřila její vhodnost pro další použití v příslušné laboratoři. Standardní nejistota měření aldosteronu metodou RIA byla stanovena na méně než 15 % [49]. Nejistota měření byla stanovena ÚLBD VFN 1. LF UK na Karlově náměstí.

**Další parametry stanovení aldosteronu byly stanoveny výrobcem a jsou součástí příbalového letáku.**

- **Citlivost**

Analytická citlivost byla stanovena na 1,44 pg/ml. Funkční citlivost byla stanovena na 6,98 pg/ml.

- **Specifita**

Protilátka používaná v tomto měření je vysoce specifická pro aldosteron. Proti ostatním přirozeně vyskytujícím se steroidům byly zjištěny extrémně nízké zkřížené reakce.

- **Opakovatelnost**

Vzorky byly 25x proměřeny ve stejné sérii. Variační koeficient byl stanoven na 12,6 %.

- **Mezilehlá preciznost**

Vzorky byly 10x proměřeny v dubletu. Variační koeficient byl stanoven na 17,2 %.

- **Diluční test**

Vysoce koncentrované sérové vzorky byly sériově rozpuštěny v diluentu pro sérum. Výťažnost byla stanovena mezi 94,7 % – 117 %.

- **Měřicí rozsah metody**

1,44 – 2000 pg/ml.

### 3.2.3 Analytické parametry stanovení reninu

Ke stanovení reninu byla použita metoda IRMA. Metoda stanovení reninu není akreditovaná metoda. U této metody nebyla nejistota stanovena [49]. Další informace o analytických parametrech metody se v příbalovém letáku nevyskytovaly.

## 3.3 Materiál

### 3.3.1 Analyzované látky

Analýzovaným materiálem byla krev a sliny. Na odběru krve se podílelo 66 dobrovolníků ve věkovém rozmezí 19 – 68 let. Každému z nich bylo odebráno 10 ml krve. Žen se zúčastnilo 33 a muži byli zastoupeni také počtem 33. Vzorky krve byly zpracovány podle běžných laboratorních postupů. Koncentrace kortizolu a CBG byly měřeny v séru. Hladiny aldosteronu a reninu byly stanoveny v plazmě. Vzorek slin poskytl pouze 35 dobrovolníků z celkového počtu dobrovolníků, kteří darovali vzorek krve. Pro jedno stanovení je obvyklý objem 20  $\mu$ l vzorku slin. Pro správné pipetování analyzátoru je však nutný mrtvý objem - alespoň 150  $\mu$ l.

### 3.3.2 Postup odběru vzorku

Odběr vzorků krve byl proveden odborným zdravotnickým personálem VFN 1. LF UK na Karlově náměstí. Plazma byla získána z plné nesrážlivé krve. Ta byla odebírána do zkumavek potažených EDTA, aby se zabránilo hemokoagulaci. Za laboratorní teploty byly zkumavky odstředěny, aby se oddělila plazma a EDTA. K získání séra byly použity zkumavky se separačním gelem. Vytvořená sraženina byla separována (odstraněna) centrifugací. Jelikož nebyla většina vzorků analyzována v průběhu 48 hodin po odběru, byly zkumavky se vzorky zmrazeny na teplotu  $-20^{\circ}\text{C}$ . Po rozmrazení byly pečlivě promíchány a byly odstraněny vzduchové bubliny. Souběžně s odběrem krve probíhal i odběr slin.

K odběru slin byl použit systém Salivette od firmy Sarstedt, díky němuž může být monitorována hladina kortizolu ve slinách. Metoda umožňuje analyzovat malá množství slin obsahující nízké hladiny kortizolu. Sliny byly odebírány do dvou typů salivet. Oba dva typy jsou složeny ze stejných částí, ale liší se druhem buničiny, do které jsou nasáknuty sliny. Bílé salivety obsahují buničinu s malým množstvím kyseliny citrónové, zatímco modré obsahují buničinu syntetickou.

Odběr bylo nutné provádět nejméně 30 minut po jídle. Dále nesměl dobrovolník pít, kouřit ani si čistit zuby, aby nedošlo k znehodnocení vzorku. Současně s odběrem krve dobrovolník převaloval v ústech buničinu po dobu minimálně 1 minuty. Až do zpracování v laboratoři byly vzorky uchovávány v chladu. Poté byly vzorky slin centrifugovány 10 min při 6000 otáčkách. Spodní části zkumavek se slinným supernatantem byly zazátkovány a uchovány při  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 3.4 Statistické postupy

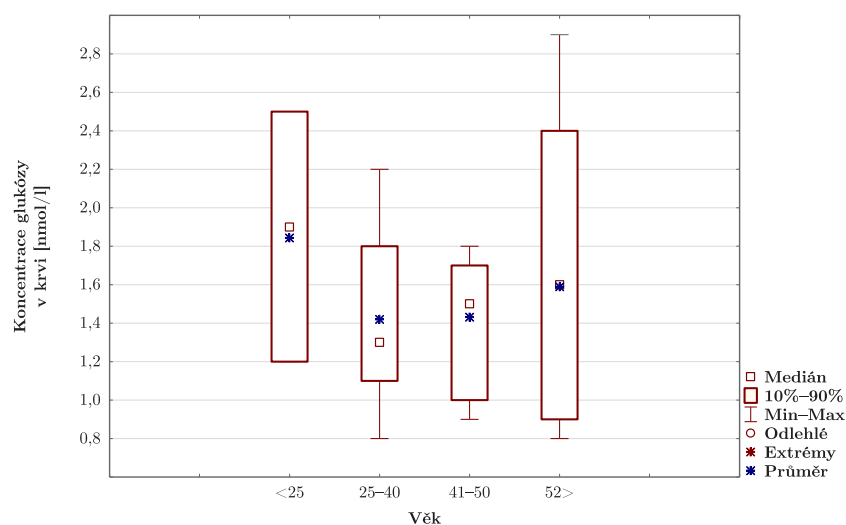
K vytvoření grafů a statistických údajů byly použity programy Microsoft Excel 2010, StatSoft, Inc. STATISTICA, version 12 a MedCalc, Inc.. Ve všech souborech byl vypočítán aritmetický průměr, medián a byla vyhodnocena normalita skupiny vzhledem k rozložení naměřených dat. Odlehlé hodnoty jsou v krabicových grafech vyznačeny. Referenční interval CBG byl stanovován jako symetrický 95% percentil skupiny.



## 4 Výsledky

### 4.1 Sledovaný soubor

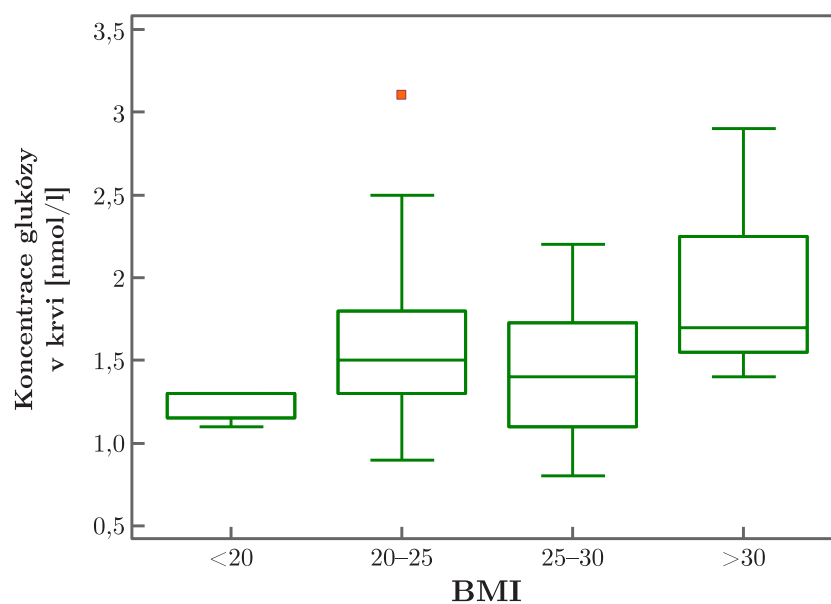
Zátěžových testů se zúčastnilo 66 relativně zdravých osob. U všech byl vypočítán BMI a zaznamenána hladina glykémie naměřená v rámci inzulínového testu. Grafy (Obr. 4.1), (Obr. 4.2) slouží k doilustrování toho, jak soubor účastníků vypadal. Z grafů je vidět, že věk nehraje významnou roli v dosažené hladině glukózy a BMI hraje roli pouze tehdy, když přesahuje hodnotu 30.



Obrázek 4.1: Graf závislosti koncentrace glukózy v krvi na věku.

### 4.2 Posouzení ITT a porovnání hladin kortizolu v séru a slinách

Jedním ze stanovených cílů bylo posoudit dynamický test ITT a vhodnost slin jako biologického materiálu namísto běžně používaného materiálu – krve. Z celkového počtu 58 kontrol poskytlo vzorek slin pouze 35 dobrovolníků. Vzorek krve poskytlo všech 58 kontrol. Vzorky byly odebírány současně ve 20., 30., 40., 60., 90. a 120. minutě. Tabulka 4.1 a 4.2 uvádí parametry srovnávaných souborů vzorků slin a krve.



Obrázek 4.2: Graf závislosti koncentrace glukózy v krvi na BMI.

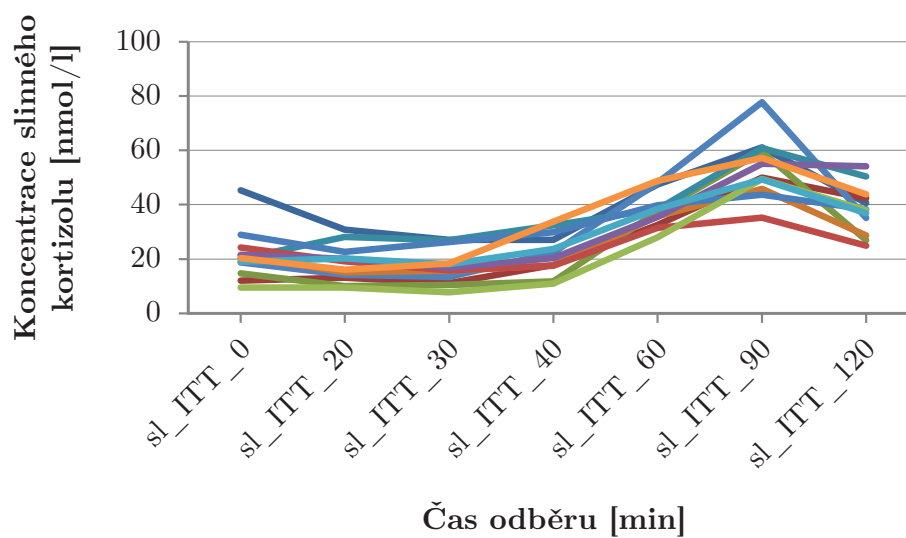
Tabulka 4.1: Parametry stanovovaných souborů slinného kortizolu u ITT (u vzorků slin)

	[nmol/l]						
	0. min	20. min	30. min	40. min	60. min	90. min	120. min
medián	20,11	16,49	16,52	21,87	38,37	44,37	32,10
průměr	20,00	17,79	17,23	23,50	38,17	42,96	36,16
minimum	3,38	2,90	1,97	3,37	2,23	6,45	4,59
maximum	55,35	55,82	50,32	62,21	73,73	78,26	97,54

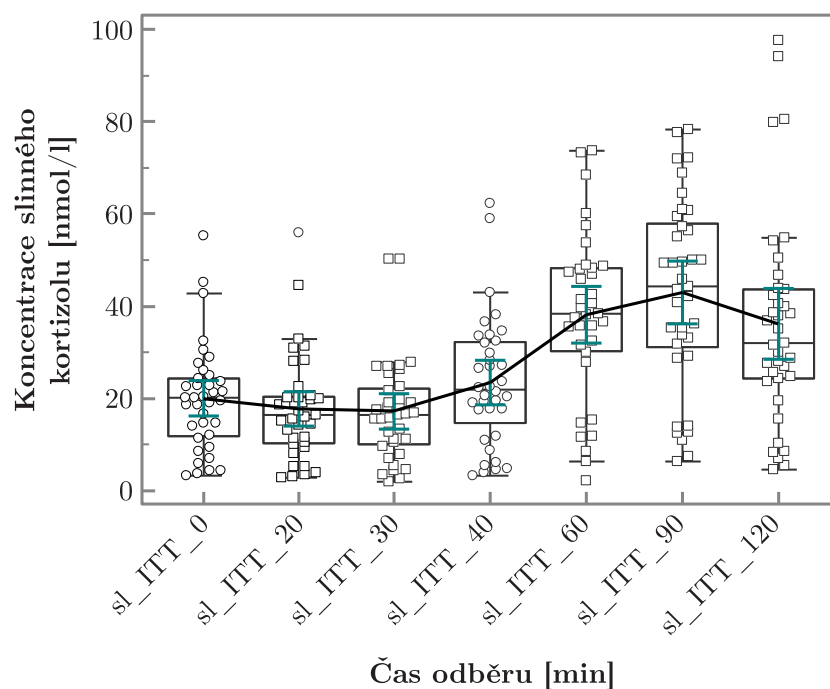
Z grafů (Obr. 4.3), (Obr. 4.4) je patrné, že nejvíce dobrovolníků dosáhlo maximální koncentrace slinného kortizolu v 90. minutě od i.v. podání inzulínu. Přesněji 34,29 % osob z celkového počtu 35, kteří poskytli vzorek slin. Naopak u sérových vzorků dosáhlo nejvíce dobrovolníků maximální koncentrace sérového kortizolu v 60. minutě. Přesněji 36,21 % kontrol z celkového počtu 58, kteří poskytli vzorek krve (Obr. 4.5), (Obr. 4.6).

Tabulka 4.2: Parametry stanovených souborů sérového kortizolu u ITT (u vzorků u vzorků séra)

	[nmol/l]						
	0. min	20. min	30. min	40. min	60. min	90. min	120. min
medián	347,85	317,10	367,57	528,07	635,25	629,95	560,28
průměr	364,85	328,81	362,37	508,35	621,57	604,15	552,17
minimum	141,30	141,30	55,36	109,80	224,50	78,30	27,80
maximum	622,03	563,60	622,61	710,50	850,10	906,99	847,09

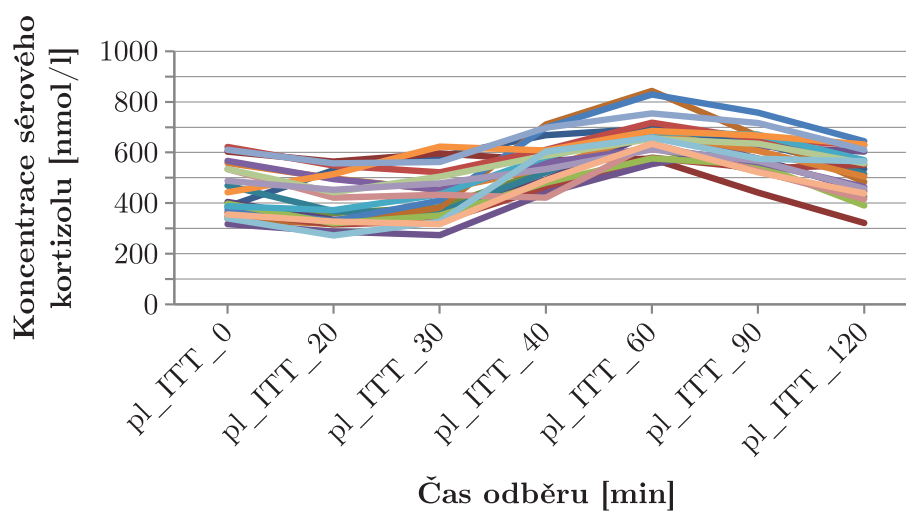


Obrázek 4.3: Graf závislosti koncentrace slinného kortizolu na čase odběru u ITT.

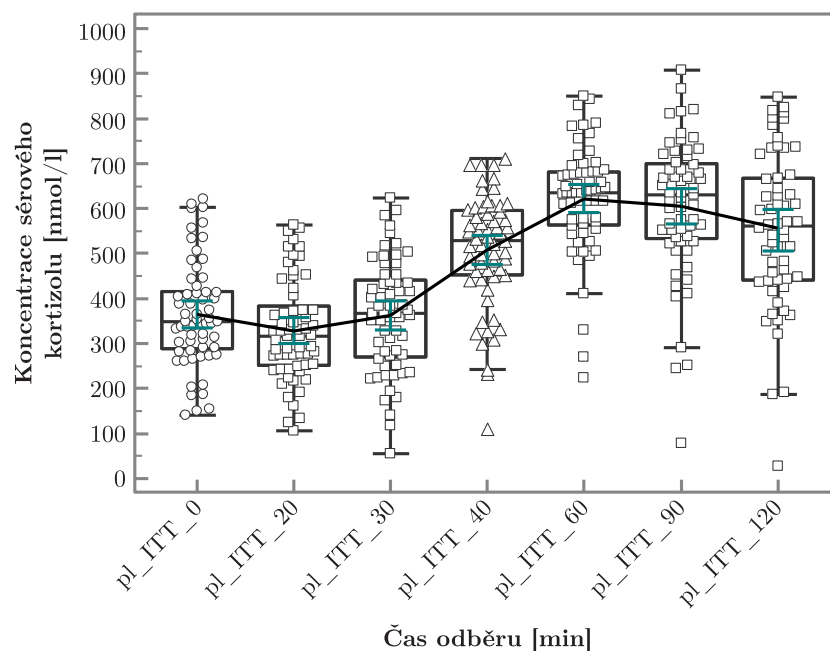


Obrázek 4.4: Průběh hladin slinného kortizolu v jednotlivých minutách odběru.

„Křabicové diagramy“ znázorňují rozsah hladin slinného kortizolu v daném čase odběru. V každém diagramu je znázorněna průměrná hodnota koncentrace slinného kortizolu typická pro danou skupinu. Zároveň je u každého diagramu vyznačeno ohraničení pro daný soubor účastníků.



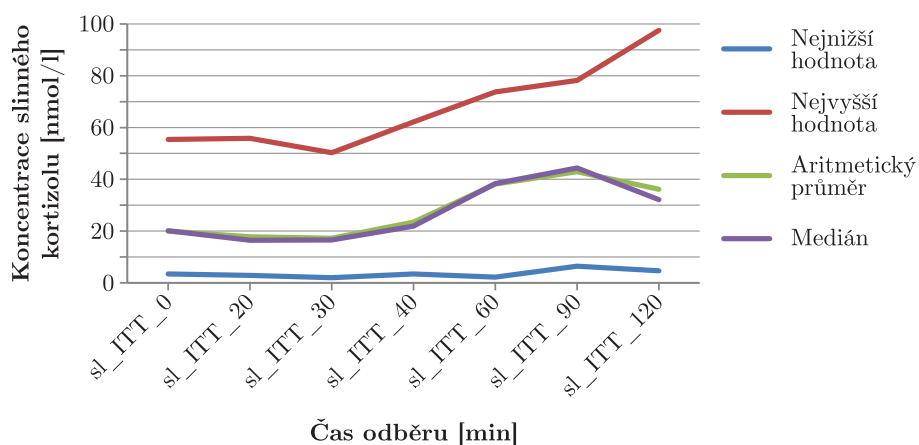
Obrázek 4.5: Graf závislosti koncentrace sérového kortizolu na čase odběru u ITT.



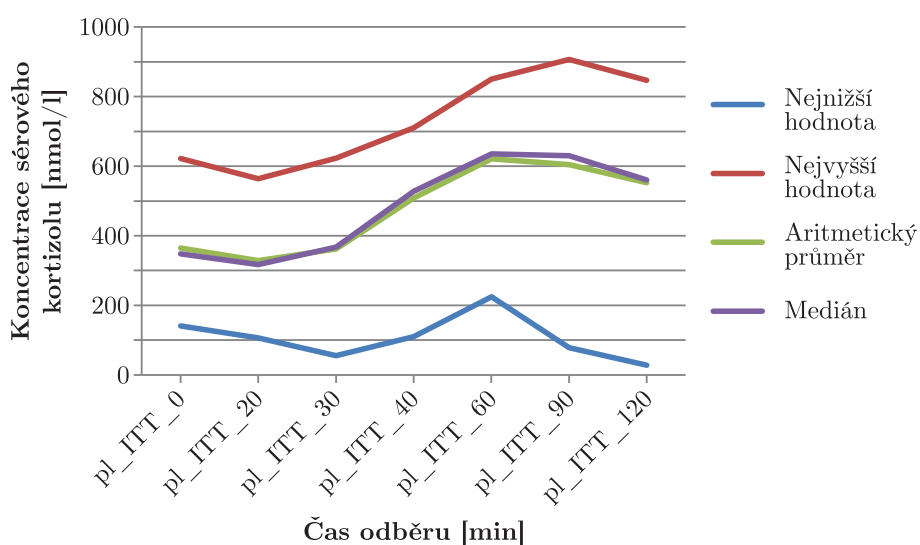
Obrázek 4.6: Průběh hladin sérového kortizolu v jednotlivých minutách odběru.

„Křabicové diagramy“ znázorňují rozsah hladin sérového kortizolu v daném čase odběru. V každém diagramu je znázorněna průměrná hodnota koncentrace sérového kortizolu typická pro danou skupinu. Zároveň je u každého diagramu vyznačeno ohraničení pro daný soubor účastníků.

Pro další posouzení spolehlivosti slin oproti séru byly vytvořeny grafy, které znázorňují nejnížší a nejvyšší hodnoty daných souborů poskytující vzorky slin a krve. Z grafu (Obr. 4.7) vyplývá, že nejnížší a nejvyšší hodnoty slinného kortizolu nekopírují střední hodnotu celého souboru 35 kontrol. Oproti tomu z grafu (Obr. 4.8) je na první pohled patrné, jak průběhy nejnížší i nejvyšší hodnoty sérového kortizolu daného souboru 58 kontrol kopírují průběh křivky střední hodnoty.

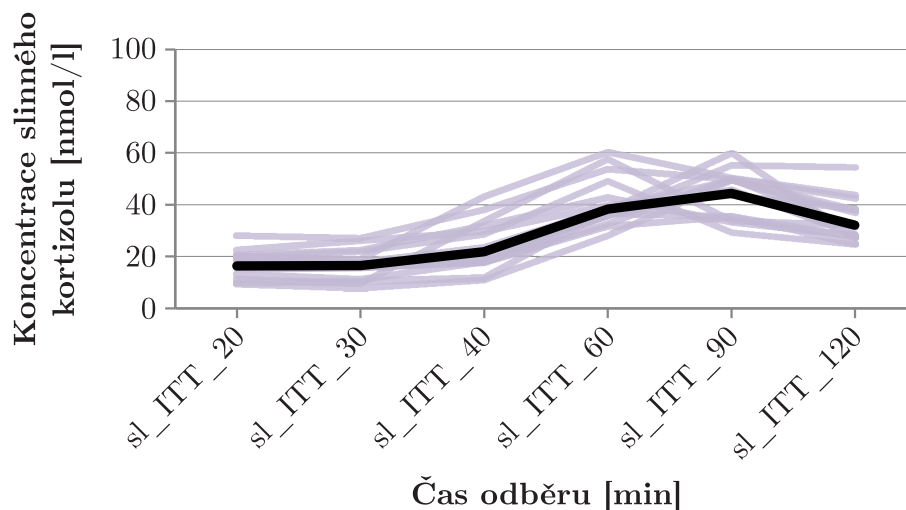


Obrázek 4.7: Průběh nejvyšší, nejnižší a střední hodnoty slinného kortizolu zkoumaného souboru 35 kontrol.



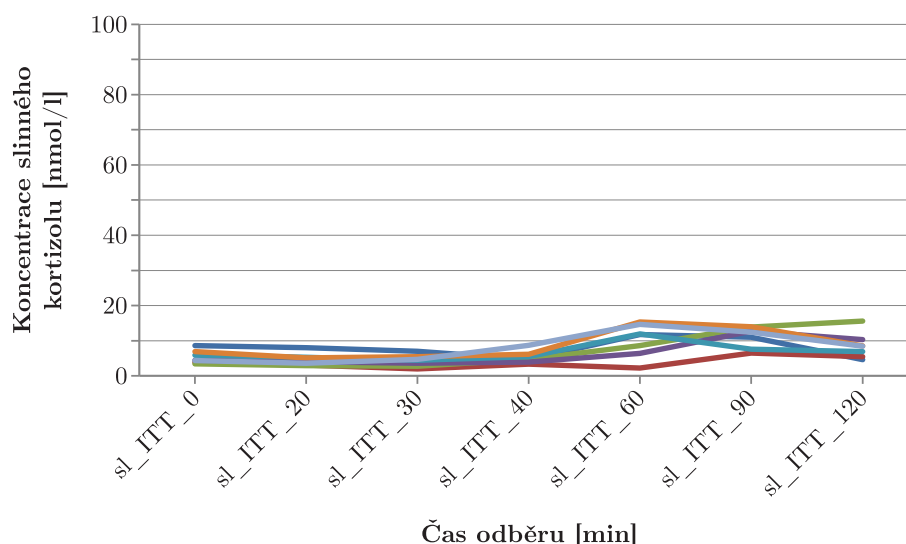
Obrázek 4.8: Průběh nejvyšší, nejnižší a střední hodnoty sérového kortizolu zkoumaného souboru 58 kontrol.

Pro další ověření vhodnosti slin jako biologického materiálu byl sestrojen graf, který znázorňuje kontroly, které svými průběhy křivek kopírovaly tvar křivky mediánu (Obr. 4.9).



Obrázek 4.9: Průběhy hladin slinného kortizolu, které kopírují svým průběhem křivku mediánu.

Při hodnocení hladin slinného kortizolu u ITT se vyskytl soubor 7 kontrol, který nepřesáhl hladinami slinného kortizolu hodnotu 10 nmol/l (Obr. 4.10). Z celkového počtu 35 kontrol, které poskytly vzorek slin, nebylo možné 20 % kontrol ohodnotit. Jejich hladina sahala pod hranici blízkou detekčnímu limitu metody 10 nmol/l. U 6 ze 7 těchto kontrol byla prokázána korelace s plazmatickými koncentracemi kortizolu, jelikož ani u těch nebylo dosaženo minimální koncentrace kortizolu v plazmě 500 nmol/l.



Obrázek 4.10: Koncentrace slinného kortizolu sahající pod 10 nmol/l.

### 4.3 Posouzení vhodnosti zátěžových testů s různými dávkami synacthenu

Jedním z cílů bylo posoudit vhodnost jednotlivých zátěžových testů. U jednotlivých osob byly provedeny čtyři zátěžové testy – inzulinový toleranční test, vysoko zátěžový test (250  $\mu$ g synacthenu), středně zátěžový test (10  $\mu$ g synacthenu) a nízko zátěžový test (1  $\mu$ g synacthenu). Tabulka 4.3 uvádí parametry sledovaných souborů, které se mezi sebou liší v závislosti na použitém druhu testu. Procentuální zastoupení zdravých kontrol v rámci jednotlivých cut off hodnot jsou zaznamenány v tabulce 4.4. Z uvedených výsledků je patrné, že LDST test je vhodný pro posuzování hypokortikalismu. Inzulinový test zůstává testem první volby.

### 4.4 Posouzení imunoanalytických metod z analytického hlediska

Pro stanovení hladin kortizolu v biologických materiálech byla použita chemiluminiscenční imunoanalýza. Stanovení aldosteronu, reninu a CBG bylo provedeno pomocí radioimunoanalytických metod. Stanovení kortizolu je akreditovaná metoda. Součástí práce je verifikační protokol, ve kterém jsou zaznamenány analytické parametry metody (Příloha 1). V rámci analýzy byla provedena stanovení kontrolních materiálů. Všechny výsledky těchto kontrolních vyšetření se pohybovaly v povoleném rozmezí. U akreditované metody na stanovení aldosteronu z verifikačního protokolu plyne, že metoda je vhodná pro použití v laboratoři. Nejistota akreditované metody



Tabulka 4.3: Parametry jednotlivých srovnávaných zátěžových testů

		[nmol/l]			
		< 500	500 – 549	550 – 600	600 >
HDST $n = 62$	Počet kontrol	0	3	1	58
	Zastoupení kontrol v %	0	4,84	1,61	93,55
MDST $n = 63$	Počet kontrol	1	1	4	57
	Zastoupení kontrol v %	1,59	1,59	6,35	90,48
LDST $n = 65$	Počet kontrol	1	7	12	45
	Zastoupení kontrol v %	1,54	10,78	18,46	69,23
ITT $n = 58$	Počet kontrol	5	4	4	45
	Zastoupení kontrol v %	8,62	6,90	6,90	77,59

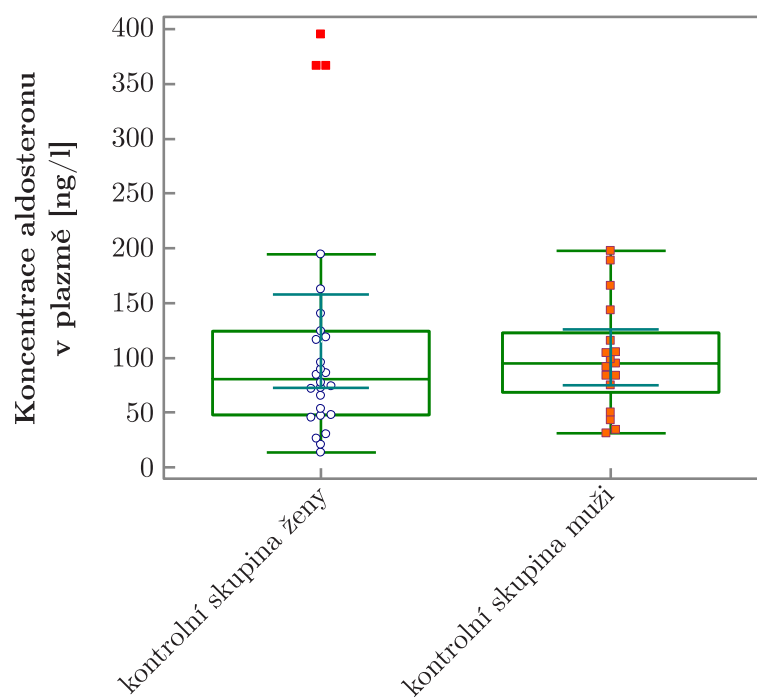
Tabulka 4.4: Procentuální zastoupení zdravých kontrol v rámci jednotlivých cut off hodnot

		Cut off [nmol/l]		
		500	550	600
HDST	Zastoupení zdravých kontrol v %	100,00	95,16	93,55
HDST		98,41	96,82	90,48
HDST		98,46	87,68	69,23
HDST		91,38	84,48	77,58

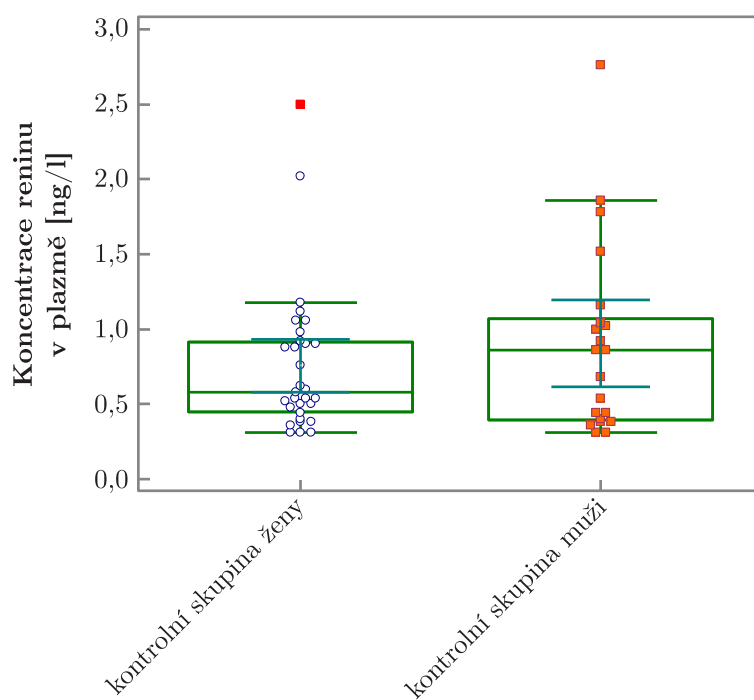
na stanovení aldosteronu byla stanovena na  $< 15\%$ . Použité metody pro stanovení reninu a CBG nejsou akreditované. I u těchto vyšetření se před každou sérií stano-vovaly kontrolní vzorky. Kontroly vyšly v pořádku.

## 4.5 Stanovení hladiny aldosteronu a reninu

U jednotlivých testů byly v plazmě stanoveny bazální hladiny aldosteronu a reninu u 50, resp. 54 probandů. Z naměřených hodnot byla ověřena použitelnost referenčního intervalu, který byl přijat z dokumentace od výrobce. V grafu Obr. (Obr. 4.11) je vidět rozmezí hladin aldosteronu naměřených z bazálních odběrů. Graf (Obr. 4.12) znázorňuje průběhy hladin reninu naměřených z bazálních odběrů.



Obrázek 4.11: Znázornění referenčních intervalů plazmatického aldosteronu u žen a mužů.



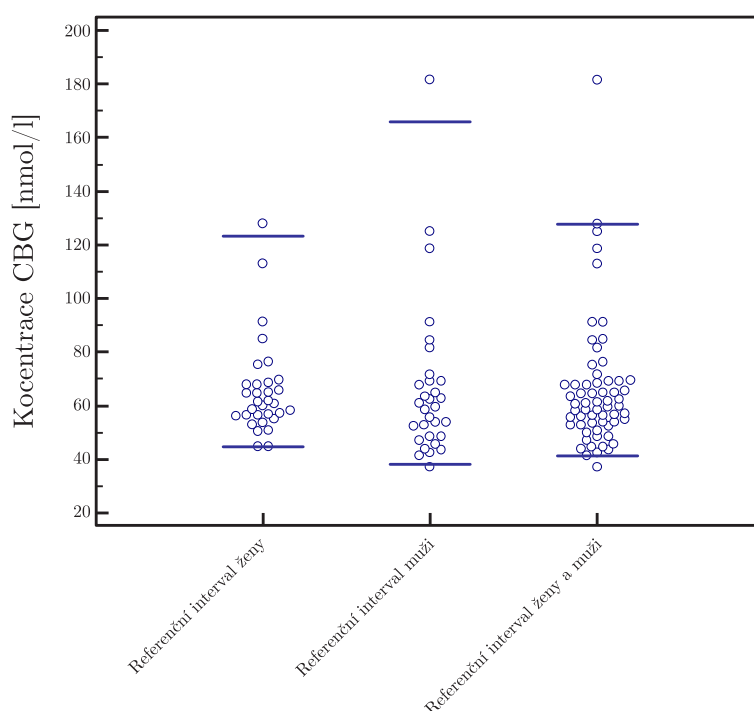
Obrázek 4.12: Znázornění referenčních intervalů plazmatického reninu u žen a mužů.

## 4.6 Stanovení referenčního intervalu CBG

Pro stanovení referenčního intervalu byl použit 95% interval ve studované skupině. Skupina 63 dobrovolníků byla rozdělena na ženy a muže bez rozdílu věku. Referenční intervaly jednotlivých skupin jsou uvedeny v tabulce 4.5. Statistické údaje z výše uvedené tabulky jsou graficky znázorněny na obrázku (Obr. 4.13). Rozložení celého sledovaného souboru je znázorněno na obrázku (Obr. 4.14).

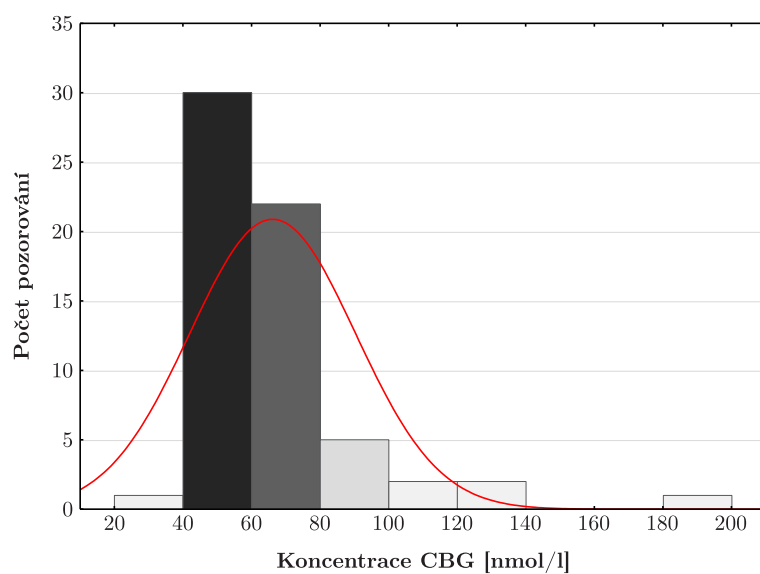
Tabulka 4.5: Referenční intervaly a statistické údaje jednotlivých skupin

	Počet vzorků	Průměr [nmol/l]	Medián [nmol/l]	Minimum [nmol/l]	Maximum [nmol/l]	Percentil 0,025	Percentil 0,975
ženy	33	65,26	60,65	44,50	127,75	44,54	123,25
muži	33	65,28	59,30	31,00	180,50	38,17	165,96
ženy i muži	66	65,27	60,13	37,00	181,50	41,33	127,54



Obrázek 4.13: Srovnání referenčních intervalů sérového CBG u žen a mužů.

*Diagramy znázorňují minimální a maximální hodnotu koncentrace sérového CBG vždy pro danou skupinu dobrovolníků. Modré linie ohraničují referenční intervaly pro skupinu žen, mužů a pro ženy a muže dohromady.*

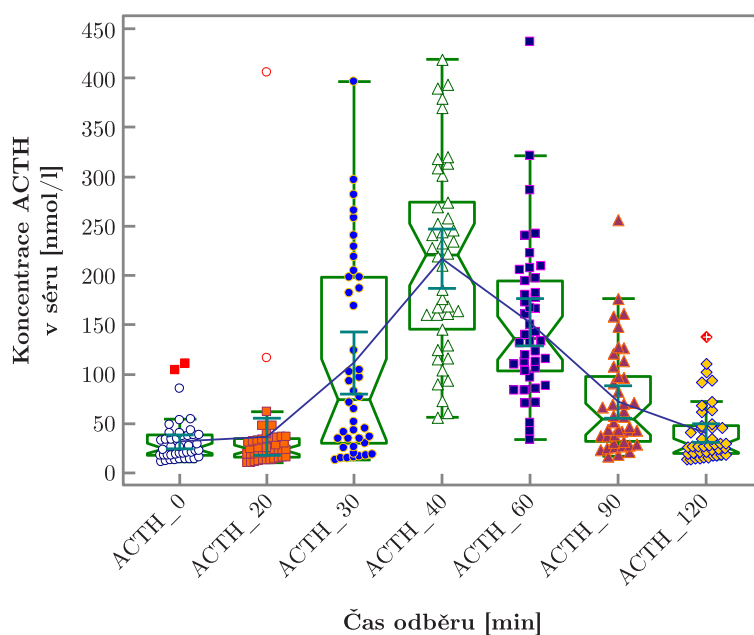


Obrázek 4.14: Početní zastoupení dobrovolníků v daných rozmezích hladin CBG.

*Červená křivka znázorňuje rovnoměrné rozložení souboru.*

## 4.7 Sledování hladin ACTH v průběhu inzulinového testu

V rámci této práce byl ověřen průběh hladin ACTH kontrolního souboru u inzulinového testu. U 42 účastníků ITT testu byla stanovena hladina ACTH v příslušných minutách. Průběhy hladin ACTH u tohoto souboru osob je znázorněn na grafu (Obr. 4.15). Celkem 16 dobrovolníků dosáhlo maximální koncentrace ACTH ve 40. minutě. Stejní účastníci měli maximální hladiny sérového kortizolu v 60. minutě.



Obrázek 4.15: Graf závislosti koncentrace ACTH v séru na času odběru.

## 5 Diskuze

### 5.1 Sledovaný soubor

Odebíranými biologickými materiály byly krev a sliny. Analýza vzorků moči nebyla předmětem této části zpracování grantu. Nicméně pro veškerá stanovování grantu byla moč odebírána.

Jak u krve, tak u slin se jednalo o kontrolní vzorky. To znamená, že byly poskytnuty skupinou dobrovolníků. Ve většině případů šlo o zdravotní sestry, lékaře, ale kontrolami se staly i pacienti s jiným typem onemocnění. Vzorky byly odebírány vždy až po podepsání informovaného souhlasu, protože každý z dobrovolníků podstupoval zátěžové testy vyvolávající hypoglykémii, vedoucí v krajních případech ke kómatu. Vzorky jsou v rámci grantu odebírány i pacientům s poruchou tvorby kortizolu. Tento soubor není zahrnut do této práce vzhledem k dosud malému počtu pacientů s tímto relativně vzácným onemocněním. Nasbírání dostatečně velkého souboru pacientů je časově náročné. Výsledky vyplývající ze skupiny patientských vzorků budou součástí řešení celého grantu.

Experimentální části se v rámci této diplomové práce účastnilo 66 dobrovolníků ve věkovém rozmezí 19 — 68 let. U všech 66 osob byl vypočítán BMI a proveden inzulinový test, při němž byla stanovena hladina glukózy. Při vyhodnocování ITT bylo zjištěno, že věk nehraje významnou roli v dosažené hladině glukózy (Obr. 4.1). V grafu (Obr.4.2) je vidět, že BMI může mít vliv na dosažení hypoglykémie, pokud je jeho hodnota větší než 30. Pak je těžší dosáhnout požadované hranice hypoglykémie 2,2 mmol/l [27]. To může být způsobeno také tím, že lidé s obezitou trpí častěji poruchami metabolismu a diabetem mellitu druhého typu.

### 5.2 Posouzení inzulinového testu a porovnání hladin kortizolu v séru a slinách

Inzulinový toleranční test je považován za zlatý standard ve vyšetřování funkce osy hypotalamus – hypofýza – kůra nadledvin. Jeho součástí je vyvolání těžké hypoglykémie, potenciálně velmi nebezpečného stavu. Zároveň je pacient zatížen opakujícími se odběry krve, které v mnoha případech ztíží již tak náročný test. Proto bylo jedním z cílů zjistit, zda je možné nahradit běžně užívaný biologický materiál – krev za biologický materiál – sliny odebírané neinvazivní metodou. Tím by bylo možné předejít mnohačetnému odběru a snížit by se faktor stresu, který podstatně

ovlivňuje naměřenou hladinu kortizolu a dosažené výsledky.

V kontrolní skupině 66 osob se nepodařilo získat vzorek krve ve všech odběrových časech u 8 z nich. Vzorek slin se podařilo současně odebrat pouze u 35 kontrolních osob. Hladina kortizolu byla porovnána ve všech odebraných vzorcích.

Z naměřených výsledků vyplývá (Obr. 4.3; 4.4 a Obr. 4.5, 4.6), že maximální koncentrace kortizolu ve slinách byla ve většině případů (34%) naměřena v 90. minutě. U séra bylo maximum obvykle v 60. minutě. Z toho vyplývá, že průběhy křivek u slin jsou oproti křivkám vzorků séra o 30 minut zpožděné. Bylo by zřejmě vhodné zavést ještě další odběr slin, např. ve 150 min, aby se zachytil opětovný pokles hladiny kortizolu i ve slinách.

Pokud by průběhy hladin kortizolu v séru a slinách byly hodnoceny z hlediska jednotlivců, je možné říci, že existují tací, kteří reagují na stimulaci pomaleji a další reagující rychleji. Při hodnocení skupiny 35 osob, u kterých byly k dispozici současně odebírané vzorky krve i slin, jsme mohli rozdělit výsledky do několika skupin. První část (12 osob) mělo vrchol v 60. minutě, další skupina (6 osob) mělo shodný vrchol v 90. minutě a malá část (4 osoby) měla společný vrchol koncentrace kortizolu ve 120. minutě. Další skupinou jsou osoby, kde je hladina kortizolu ve slinách tak nízká, že se blíží detekčnímu limitu metody a není zde možné dobře rozlišit vzestup a pokles hladiny kortizolu.

Při posouzení výsledků získaných měřením hladiny kortizolu ve slinách je možné konstatovat, že nekorelují vždy s hladinami kortizolu v séru. Nejvyšší a nejnižší hodnota ze sledovaného souboru svým průběhem nekopíruje průběh křivky mediánu a aritmetického průměru (Obr. 4.7). Pravděpodobně stresem způsobené nejvyšší koncentrace kortizolu ve slinách nejsou směrodatným ukazatelem. Stejně tak nízké koncentrace slinného kortizolu pod 10 nmol/l mohou být problémem. Tato oblast je blízká detekčnímu limitu metody (5,5 nmol/l) a není možné spolehlivě odlišit vzestup a pokles hladiny kortizolu. Pro takové osoby by provádění testu s hodnocením pouze slinného kortizolu bylo problematické. To je negativem použití slin. V tomto ohledu se zdá být odběr krve vhodnější. Z grafu (Obr. 4.8) plyne, že průběh koncentrací sérového kortizolu má u všech měřených kontrolních osob obdobný průběh a je možné konstatovat, že pro tento typ testu je krev nejvhodnějším materiálem. Na druhou stranu 40 % výsledků získaných měřením slinného kortizolu odebraného ve stejném okamžiku jako krev, kopíruje medián souboru (Obr. 4.9). Plošně tedy odběr slin namísto krve použít nelze, ale individuální využití by možné bylo.

Provedení inzulinového testu je pro pacienty velice náročné. Možnou alternativou by mohl být odběr vzorku slin v klidovém režimu. V případě nepříznivého vyhodno-

cení koncentrací slinného kortizolu by následoval inzulinový toleranční test. Pokud by se však prokázala vhodnost slin jako biologického materiálu u daného jedince, mohl by tak být eliminován invazivní odběr krve.

U některých kontrolních vzorků nebylo možné hladiny slinného kortizolu k hodnocení funkce osy HPA použít (Obr.4.10), protože hladiny kortizolu byly velmi nízké v okolí detekčního limitu metody. Jedná se o poměrně velkou část asi 20 % testovaných osob. Je možné, že tato situace je způsobena zvýšenou tvorbou slin, která vede k většímu naředění odebíraného materiálu. V tomto případě se jeví jako velmi významný výběr metody stanovení kortizolu. Dosud používané imunoanalytické metody naráží na své hranice právě v oblasti meze detekce. Pokud by byla použita citlivější metoda, například LC-MS/MS, mohly by být stanoveny hladiny kortizolu i u dosud vyřazovaných 20 % dobrovolníků.

U osob s nízkými hladinami slinného kortizolu (pod 10 nmol/l) byly naměřeny i nízké hladiny kortizolu v séru (6 ze 7), takže se i zde prokázala korelace mezi vzorky slin a séra. Přesto se i zde potvrdila nejednoznačnost použití slin jako biologického materiálu namísto krve v rámci inzulinového testu.

### 5.3 Posouzení vhodnosti zátěžových testů s různými dávkami synacthenu

Integrita osy HPA je nezbytná a zásadní pro odpovídající reakci kortizolu na stres. Stanovený referenční ITT pro posouzení osy hypotalamus – hypofýza – nadledviny je založený na měření odpovědi kortizolu na hypoglykémii indukovanou inzulinem. I přes to, že inzulinový test je zlatým standardem pro odhalování hypokortikalismu, je velice nepříjemný a potenciálně nebezpečný. Pacientovi podstupujícímu tento test je několikrát za sebou nabírán vzorek krve, hrozí mu až kómatický stav v důsledku způsobené hypoglykémie a po celou dobu testu musí být kontrolován lékaři.

Na základě těchto skutečností byl navržen cíl se snahou nalézt jiný, vhodný test odhalující hypokortikalismus odlišnou, ne tak zatěžující metodou. Různé studie [50], [51], [52] hodnotily bazální hladinu kortizolu, hladinu kortizolu ve 30. a poté v 60. minutě jako odezvu na 250  $\mu$ g HDST. Některé publikace uvádějí, že HDST je vhodnou alternativou ITT [53, 54]. Naopak studie [55, 56], poukazují na falešně pozitivní výsledky tohoto testu. Je známo, že dávka 250  $\mu$ g je používána jako obvyklá avšak suprafyziologická dávka navržená pro testování primární AI. Některé skupiny zabývající se hodnocením osy HPA tuto dávku značně snížily a poukázaly



na to, že dávka 1  $\mu\text{g}$  je rovna dávce 250  $\mu\text{g}$  [57]. Tato studie ukázala, že nízká dávka produkovala méně falešně pozitivních výsledků, než tomu tak bylo u HDST s konvenční dávkou synacthenu 250  $\mu\text{g}$ . Podle zdroje [58] je LDST test schopný odhalit obtíže osy HPA jen za použití fyziologické dávky 1  $\mu\text{g}$ . Publikace [59] popisovala odhalování nedostatečnosti nadledvin z hlediska hodnot cut off. Maghnie et. al však dospěli k názoru, že žádný z dynamických testů nemůže být považován za spolehlivý. Zdroj [60] popisuje, že nejvhodnější by byla možnost individuálního výběru zátěžového testu pro každého z pacientů.

Hodnoty cut-off pro stanovení hypokortikalismu se v mnoha publikacích liší. Dekkers a jeho spolupracovníci uvádí, že hladina kortizolu 500 nmol/l je vhodná hladina kortizolu pro cut-off HDST testu, naopak u LDST testu dosáhlo této hodnoty menší množství pacientů [28]. Jiný výzkum prokázal, že u HDST je pro klinické rozhodování lepší hodnota cut-off sérového kortizolu 600 nmol/l, aby byly vyloučeny falešně pozitivní výsledky [50].

Aby bylo možné tyto skutečnosti ověřit i v rámci zdravých kontrol, byla posouzena vhodnost jednotlivých synacthenových testů z hlediska rozhodovací meze (hodnota cut off). Dále bylo provedeno srovnání nízkodávkového a vysokodávkového testu a jejich vhodnost jako ekvivalentu k ITT.

### 5.3.1 Inzulinový toleranční test

Jedním z kritérií pro posouzení správné funkce nadledvin je u ITT nárůst koncentrace kortizolu v séru minimálně na 500 nmol/l nebo nárůst o minimálně 225 nmol/l mezi hladinami během testu [27]. Po vyhodnocení našeho 58 – členného souboru kontrol bylo zjištěno, že pokud použijeme jako rozhodovací mez pouze hladinu 500 nmol/l, splňuje to to kritérium 91,4 % viz Tab. 4.3 a Tab. 4.4. Publikace [25] při zavedení hodnoty cut off 500 nmol/l uvádí, že byly zaznamenány výsledky s falešně pozitivními výsledky nejen u nemocných pacientů, ale i u zdravých dobrovolníků. Při současném použití druhého kritéria, tedy nárůstu o minimálně 225 nmol/l, obě kritéria splní 98,3 % zdravých kontrol a pouze jedna osoba nesplňuje nastavená kritéria. Vzhledem k tomu, že se jedná o minimální odchylky, je možné je vysvětlit nedodržením preanalytiky nebo nejistotou samotného imunoanalytického stanovení kortizolu.

Cílem této práce není posuzovat výsledky zátěžových testů u pacientů. Onemocnění hypokortikalismem je poměrně vzácné a větší soubor se sbírá jen velmi pomalu, ale při pohledu na výsledky takových osob (nejsou součástí této práce) je

možné konstatovat, že se hladiny kortizolu pohybují hluboce pod hranicí 500 nmol/l; obvykle kolem 100 nmol/l.

Z toho vyplývá, že i kontroly, u kterých byly naměřeny hodnoty kolem 350 či 400 nmol/l a měly by být vyloučeny z důvodu nadledvinové nedostatečnosti, by mohly být označeny za zdravé. I když se v tomto případě hranice 500 nmol/l jeví jako zbytečně vysoká, je nutné tuto stanovenou hranici respektovat už s ohledem na rozdílnost metod stanovení kortizolu. I přes to je zátěžový test s inzulinem standardní metodou neboli testem první volby.

### **5.3.2 Zátěžový test s vysokou dávkou synacthenu**

Výsledky naznačují, že HDST 250  $\mu$ g synacthenu je vhodný pro účely klinického posuzování osy HPA za použití hodnoty cut off 500 nmol/l viz (Tab. 4.3 a 4.4). Při cut off 500 nmol/l lze v tomto případě se 100% spolehlivostí určit, že se jedná o zdravé osoby, neboť všech 62 zúčastněných kontrol dosáhlo požadované hodnoty 500 nmol/l. Za normální by mohlo být také považováno zvýšení sérového kortizolu na hodnotu 550 nmol/l. V tomto případě by bylo z vyšetřovaného souboru za zdravé kontroly označeno 95,2 % účastníků. Dále zkoumaná hranice cut-off 600 nmol/l není vhodná, neboť zařadí některé vyšetřované s normální funkcí mezi insuficientní. Pak by již z celkového počtu bylo označeno za nemocné 6,5 % kontrol.

### **5.3.3 Zátěžový test s nízkou dávkou synacthenu**

U 65 kontrol, které podstoupily LDST bylo zjištěno, že za použití hodnoty cut off 500 nmol/l bylo zdravých 98,5 %. Jeden dobrovolník z celého souboru nedosáhl hranice 500 nmol/l. V případě vysoko zátěžového testu tento dobrovolník při cut off 500 nmol/l dosáhl koncentrace kortizolu v séru nad 600 nmol/l. U případů jako je tento, by bylo vhodné pro zpřesnění výsledků a upřesnění zdravotního stavu pacienta provést HDST, který je tedy v posuzování hypokortikalismu 100%, ale na druhou stranu zatěžuje organismus zbytečně vysokou dávkou synacthenu.

Přibližně 98% úspěšnost tohoto testu přispívá k jeho použití při posuzování osy hypotalamus – hypofýza – kůra nadledvin jako první namísto HDST. Tím by pacient nemusel být zbytečně zatížen vysokou dávkou synacthenu, ale pouze 1  $\mu$ g ACTH<sup>1–24</sup>.

V tomto případě není nutné hodnotu cut-off jakkoli upravovat – snižovat. Snižováním by se sice dosáhlo lepších výsledků, ale definice LDST by nebyla zachována. Naopak při vyšších hodnotách cut-off (Tab. 4.3, 4.4), by počet pacientů s podezřením na hy-

pokortikalismus značně stoupl. U LDST není pochyb, že pokud chceme tento méně zátěžový test používat, je nutné zachovat hodnotu cut-off 500 nmol/l.

### 5.3.4 Zátěžový test se střední dávkou synacthenu

Další alternativou zátěže syntetickým ACTH<sup>1-24</sup> byl středně zátěžový test, kdy byla u zdravých osob sledována hladina kortizolu v séru v příslušných minutách po intravenózní aplikaci 10  $\mu$ g synacthenu. Použití tohoto testu se nabízí proto, že u LDST je velice obtížné správně naředit používaný 1  $\mu$ g synacthenu. Právě ředěním může docházet k chybám. Výsledky tohoto středně zatěžujícího testu se velmi blíží výsledkům nízko zátěžového LDST. Při cut off 500 nmol/l bylo z celkového počtu 63 za zdravé kontroly považováno 98,4 %, (Tab. 4.3, Tab. 4.4). Stejně tak jako u LDST byla i zde jedna osoba, která nedosáhla požadované cut off hodnoty. Proto by pro ověření výsledků dosažených v LDST nemělo smysl používat MDST, neboť výsledky by byly s největší pravděpodobností stejné, i když by to znamenalo menší zatížení pacienta z hlediska podané dávky. Aby mohl být hypokortikalismus s největší jistotou vyloučen, měl by být jako druhý použit opět HDST.

Výše uvedená posouzení tedy nabízí zamyšlení, zda je nutné namísto méně ohrožujících a méně zatěžujících dynamických testů používat rizikovější a pro organismus náročnější testy k ověřování správné funkce nadledvin.

## 5.4 Imunoanalytické metody

Stanovení hormonů, jejichž koncentrace se pohybuje v nmol a někdy i pmol/l, je možné v současných klinických laboratořích jen díky imunoanalytickým metodám, které používají specifickou reakci antigenu a protilátky. Tato reakce má svá omezení, imunoanalytické metody nemohou být brány jako definitivní. Na rozdíl od jiných analytických metod existuje jen několik referenčních materiálů s přesnou hladinou stanovenou definitivní metodou.

Každá metoda je před uvolněním diagnostické soupravy k použití v laboratoři validována výrobcem. Součástí tohoto procesu je krom stanovení detekčního limitu, opakovatelnosti, mezilehlé preciznosti také stanovení nejistoty metody a vlivu interferencí. Samozřejmostí je i stanovení referenčních intervalů pro zdravou populaci. Výsledky takového testování jsou pak součástí příbalového letáku, který je právě u imunoanalytických metod velmi důležitým materiálem, se kterým laboratoř při používání takových diagnostických souprav pracuje. Vzhledem k ceně takových vyšetření se zavedení nové metody v laboratoři omezuje na verifikaci, která za-

hrnuje jen omezený rozsah výše uvedených procesů a každoročně se provádí jen hodnocení interní a externí (pokud je pro daný analyt k dispozici) kontroly kvality a vyhodnocení nejistoty metody. Nejistota je definována jako parametr přidružený ke každému výsledku měření, který vyjadřuje omezené možnosti procesu měření. Absolutně přesný výsledek měření (tj. výsledek s nulovou nejistotou) neexistuje. Přítomnost nejistoty znamená, že výsledek měření není bod (jedna hodnota), ale interval – oblast, ve které se výsledek měření nachází s určitou pravděpodobností [61].

Všeobecně je možné konstatovat, že nejistota, ale i další analytické parametry, jsou u automatických analyzátorů, kde je zajištěno přesné pipetování i dodržování všech analytických podmínek (teplota, doba inkubace, měření signálu) lepší než u ručně prováděných radioimunoanalytických metod.

Pro stanovení kortizolu byla nejistota stanovena z variačního koeficientu dlouhodobého sledování vnitřní kontroly kvality pro všechny hladiny kortizolu menší než 9,5 % (viz Příloha A). Pokud tedy uvažujeme o rozhodovací hodnotě 500 nmol/l, je vhodné brát v úvahu, že se nejedná o striktně danou hladinu, ale o širší pásmo 450 – 550 nmol/l.

Obecně přijatelná hodnota nejistoty je u některých imunoanalytických metod 15 — 20 %, vždy však záleží na tom, v jakých hladinách hodnot se daný výsledek pohybuje.

Imunoanalýza je tak citlivá, jak citlivá je používaná protilátka [30]. Diagnostické soupravy různých výrobců se mezi sebou mohou lišit i poměrně výrazně, přestože stanovují stejný analyt. Velmi dobře to ilustrují výsledky externí kontroly kvality (SEKK). Zde je hodnocený analyt rozdělen podle jednotlivých výrobců a často dokonce i podle analyzátoru, na kterém je stanovení prováděno. Pro některé analyty není takové srovnání vůbec k dispozici, např. CBG, protože se jedná o velmi málo frekventované stanovení. Právě v těchto případech je pak nezbytné, aby si laboratoř stanovila vlastní referenční intervaly a používala stále stejnou metodu jednoho výrobce pro hodnocení pacientů.

Radioimunoanalýza je metodika, která je náročná na ruční práci a zkušenost laborantek. Důležité je dbát na rizika plynoucí z práce s radioaktivitou. Velkou výhodou je nižší cena diagnostických souprav, stejně tak jako nenáročnost na složitá detekční zařízení. Umožňuje stanovení vzácných analytů, které nejsou v nabídce pro automatizované analyzátory.

Jednotlivé soupravy pro stanovení určitého hormonu v séru či jiné tělesné tekutině pacienta nemusí poskytovat vždy stejný výsledek. I přesto, že jsou založeny na stejném principu [15]. To dokazuje externí hodnocení kvality (EHK). V rámci

této práce byla ke stanovení reninu použita diagnostická souprava firmy Cisbio, s využitím metody IRMA. Stanovení reninu není v laboratořích příliš běžné. Bylo možné vycházet pouze z informací uvedených v příbalovém letáku. V rámci cyklu externího hodnocení kvality (EHK): E21/15 – Endokrinologie 2 lze porovnat výsledky jednotlivých radioimunoanalýz. Na stránkách SEKK je pro stanovení reninu u výrobce Cisbio uvedena cílová hodnota u vzorku A 59,5 ng/l, pro firmu Immunotech je tato cílová hladina 64,5 ng/l. Pro stanovení reninu je u luminiscenční imunoanalýzy firmy DiaSorin uvedena cílová hodnota 48,2 ng/l.

Podobné rozdíly je možné pozorovat i u stanovení aldosteronu za využití metody RIA. Pro výrobce soupravy DiaSorin je uváděna cílová hodnota vzorku A 0,939 nmol/l, zatímco pro výrobce diagnostické soupravy Immunotech 0,677 nmol/l. Je možné tedy pozorovat velké rozdíly mezi stanovenými hodnotami různých výrobců. Jinak tomu není ani u stanovení aldosteronu luminiscenční imunoanalýzou, kde pro firmu Bicode je uvedena cílová hladina 0,875 nmol/l. Tyto hodnoty byly získány v rámci cyklu externího hodnocení kvality (EHK): E11/15 – Endokrinologie 1.

Proto je vhodné používat stále stejnou komerční soupravu, neboť výsledek může být snadno zatížený chybou. V každé sérii radioimunoanalytického stanovení se zpracovává vlastní kalibrační křivka a stanoví se hladiny kontrolních vzorků.

V dnešní době ruční imunoanalýza ustupuje do pozadí. Výjimkou není ani stanovení aldosteronu a reninu, které je momentálně převáděno na analyzátor Liaison od firmy DiaSorin využívající chemiluminiscenční imunoanalýzu. Stanovení kortizolu je běžně nabízeno několika výrobci imunoanalytických diagnostických souprav pro analyzátory. Ani v tomto případě však není možné očekávat od této metody stejné analytické parametry jako u běžných spektrofotometrických stanovení. To potvrzuje i souhrnná statistika kvantitativních výsledků v rámci externího hodnocení kvality (EHK): např. E11/15 – Endokrinologie 1. Výsledky jsou hodnoceny na základě konsenzu jednotlivých laboratoří, které používají stejnou metodiku, analyzátor a výrobce diagnostik. I u tak dobře zavedené metody, jakou je stanovení kortizolu, je možné najít rozdíly ve vztažné hladině až v desítkách procent.

## 5.5 Stanovení hladiny aldosteronu a reninu

Aldosteron a renin byly stanoveny u kontrolní skupiny pro ověření použitelnosti referenčního intervalu, který byl převzat z dokumentace výrobce. Změny hladin obou těchto hormonů jdou ruku v ruce s hladinou kortizolu [62]. Při vyšetřování hypokortikalismu je obvykle současně stanovena i koncentrace aldosteronu a reninu.

Aldosteron byl vyšetřen u skupiny 50 osob. Biologický materiál byl odebíráný v rámci prováděných dynamických testů. Jednalo se vždy o bazální odběry, tedy ještě před podáním zátěže, proto bylo možné sloučit všechny výsledky do jednoho souboru. Stejným způsobem byla vytvořena i skupina, ve které byla stanovena hladina plazmatického reninu.

Jak uvádí publikace [63], v případě primární AI se hladiny plazmatického aldosteronu nachází v dolním pásmu normálních hodnot. Pro účely posouzení jednotlivých hladin byl použit referenční interval pro bazální hodnoty aldosteronu používaný laboratoří VFN 1. LF ÚK na Karlově náměstí [49]. Z grafu (Obr. 4.11) je patrné, že hladiny aldosteronu se u jednotlivých kontrolních osob mění. Celkem 14 kontrol nespadlo do referenčního intervalu 30,0 – 150,0 ng/l pro věkovou kategorii 18 – 110 let. Problémem byla spíše horní hodnota referenčního intervalu, kterou tito dobrovolníci často přesahovali. Důvodem proč de facto zdraví lidé nespadají do referenčního intervalu, může být nedodržení preanalytických podmínek při odběru krve. Je také možné, že u daných osob, byly naměřené hladiny ovlivněny medikací, o které jsme nebyli informováni.

Podobná byla situace při vyhodnocování naměřených výsledků u plazmatického reninu. Soubor tvořilo 54 vyšetřovaných a k posouzení byl použit referenční interval laboratoře ÚBLD VFN, [49]. Graf (Obr. 4.12) však naznačuje velice rozdílné hodnoty mezi jednotlivými účastníky. Správné stanovení hladiny reninu je mimořádně citlivé na dodržování podmínek odběru a uchovávání materiálu, je možné tedy předpokládat, že odchylky od referenčního intervalu byly způsobeny právě nedodržením těchto požadavků.

## 5.6 Stanovení referenčního intervalu CBG

Celkový sérový kortizol je z více než 80 % vázaný na CBG [64]. U některých pacientů může být insuficience kortizolu způsobena nedostatečnou produkcí CBG, stanovení hladiny tohoto vazebného proteinu v rámci odhalení hypokortikalismu je považováno za základní vyšetření.

Při hodnocení laboratorních výsledků je vhodné mít k dispozici správně stanovený referenční interval, ve kterém se výsledek má pohybovat [65, 66]. Stanovení referenčního intervalu pro laboratoř je velice finančně náročné, obvykle jsou tyto údaje přejímány od výrobců diagnostických souprav. V rámci řešení grantu bylo možné toto stanovení provést, i když pro správný výpočet by bylo zapotřebí minimálně 100 zdravých osob. V tomto případě bylo ke zjištění referenčního intervalu

zahrnuto jen 63 osob a k jeho výpočtu byl použit 95% interval.

Odběry vzorků probíhaly vždy před zahájením jednoho z dynamických zátěžových testů. Aby bylo možné zjistit, zda se referenční interval liší pro jednotlivá pohlaví, byli probandi rozděleni na skupinu žen a mužů. Hodnoty referenčních intervalů jsou uvedeny v tabulce (Tab. 4.5).

Referenční interval pro skupinu žen byl 44,5 – 123,3 nmol/l, zatímco pro skupinu mužů byl 38,2 – 166,0 nmol/l (Obr. 4.13). Na základě těchto hodnot lze tedy říci, že i přes malou skupinu kontrolních vzorků, které byly k dispozici, je možné spodní hranici referenčního intervalu jak pro ženy, tak pro muže spojit. Horní hranice u skupiny mužů vyšla o něco vyšší. Horní hranice by se tedy měla rozlišovat u obou skupin. U mužů se dá považovat, že je normálnější mít vyšší hladiny CBG.

Dhillon et. al se ve své práci zabývají hodnocením hladin CBG v rámci posouzení jednotlivých dynamických testů, kdy posuzovali vhodnost používaného cut off pro kortizol ( 500 nebo 550 nmol/l) [67]. Autoři potvrzují význam stanovení hladiny CBG pro správnou interpretaci zdravotního stavu nadledvin.

## 5.7 Sledování hladin ACTH v průběhu inzulinového testu

Podezření na nedostatečnou funkci kůry nadledvin, které vyplývá z klinického vyšetření, je nutné potvrdit laboratorním vyšetřením hodnot kortizolu, většinou spolu se stanovením koncentrací ACTH. Kvantifikace vztahu ACTH a kortizolu byla provedena v rámci ověřování kritérií u ITT. U kontrolní skupiny 58 osob, které se účastnily inzulinového testu, byla vyšetřována hladina ACTH pouze u 42 z nich. Z této kontrolní skupiny dosáhlo 16 dobrovolníků maximální koncentrace ACTH ve 40. minutě (Obr. 4.15). Avšak vrcholu koncentrace sérového kortizolu dosáhlo těchto 38 % účastníků až v 60. minutě. Zdroj [68] uvádí, že u zdravých jedinců bylo dosaženo maximální koncentrace ACTH již ve 30. minutě a maximální hladina kortizolu byla naměřena v 60. minutě. V rámci studie [68] byly vzorky odebírány ve 30., 60. a 90. minutě od podání inzulinu, oproti našemu měření, kdy byl odběr proveden navíc ještě ve 20., 40., a 120. minutě. Je tedy možné, že pokud by ve studii Erturk et. al provedli stanovení ACTH ještě ve 40. minutě, byly by maximální koncentrace naměřeny také právě v této minutě. V rámci hodnocení ACTH byly další maximální koncentrace sérového ACTH naměřeny ve 40. minutě u 11 kontrol, u kterých byly nejvyšší hladiny kortizolu naměřeny až v 90. minutě. Pouze 3 dobrovolníci se v průbězích hladin kortizolu a ACTH v séru shodovali. Všichni dosáhli

maximálních koncentrací v 60. minutě.

Na základě naměřených výsledků bylo ověřeno, že inzulinem navozená hypoglykémie podnítila sekreci ACTH, který se dostal do krevního oběhu, a maximální koncentrace tohoto hormonu byly naměřeny dříve, než se začal vyplavovat kortizol.



## 6 Závěr

Hodnocení dynamických testů hypokortikalismu zahrnovalo vyšetření hladin slinného a sérového kortizolu v průběhu inzulinového testu. Maximální koncentrace kortizolu bylo dosaženo u kontrolních osob v různém časovém odstupu od zátěže. Hladiny slinného kortizolu nepřesáhly u některých dobrovolníků hodnotu 10 nmol/l, která je blízká detekčnímu limitu metody stanovení (ADVIA: Centaur, Siemens) a nebylo tedy možné doporučit u těchto osob sliny jako vyšetřovaný materiál. Asi 40 % výsledků kopírovalo průběhem hladin slinného kortizolu průběh křivky mediánu koncentrací sérového kortizolu u daného souboru. Pokud bychom chtěli pracovat se slinami jako biologickým materiálem a stanovovat v něm hladiny kortizolu, je nutné použít citlivou metodu, která má nižší detekční limit, například LC/MS/MS. Nahradit plošně odběr krve neinvazivním odběrem slin nelze. Individuální využití slin, zvláště pro jeho nízkou stresující zátěž při odběru, je reálné.

V kontrolní skupině byly provedeny zátěžové testy s různě vysokou dávkou synacthenu. Vysoko zátěžový test (HDST) užívá 250  $\mu$ g synacthenu a ve všech případech se projevilo zvýšení hladiny kortizolu nad 500 nmol/l, což je hladina používaná jako rozhodovací mez v těchto testech. V případě použití jen nízké dávky synacthenu, pouze 1  $\mu$ g, hladiny 500 nmol/l dosáhlo jen 98,5 % osob ze skupiny.

Referenční intervaly pro aldosteron a renin, přejaté z dokumentace výrobce, nebylo možné objektivně posoudit. Teoreticky zdravá skupina účastníků svými hladinami, naměřenými v bazálních vzorcích odebraných před zátěžovými testy, nespadala do mezí příslušných intervalů. Někdy až 100% rozdíly hodnot byly způsobeny pravděpodobně nedostatečným dodržením preanalytiky (např. odběr a transport vzorku v ledu) nebo medikací, o které daná osoba předem neinformovala.

Stanovení hladin CBG umožnilo vypočítat referenční intervaly pro skupinu žen 44,5 – 123,3 nmol/l a pro skupinu mužů 38,2 – 166,0 nmol/l. Vzhledem k podobnosti dolních hladin intervalů je bylo možné u obou skupin sjednotit. Naopak horní hranice zůstaly zachovány pro obě skupiny.

Stanovením hladin ACTH v průběhu inzulinového testu bylo ověřeno, že maximálních koncentrací tohoto hormonu bylo dosaženo dříve, než byly naměřeny u sérového kortizolu.

Veškeré výsledky dosažené v této diplomové práci budou součástí řešení celého grantu, který je prováděn na III. interní klinice VFN a 1. LF UK v Praze na Karlově náměstí.

# Literatura

- [1] Ganog, W. F.; *Přehled lékařské fyziologie*. 20. přeprac. vyd. Praha, Galén 2005.
- [2] Trojan, S.: *Lékařská fyziologie*. 4. přeprac. vyd. Praha, Grada Publishing a. s. 2003.
- [3] Perogamvros, I.; Ray, D. W.; Trainer, P. J.: Regulation of cortisol bioavailability—effects on hormone measurement and action. *Nature Reviews Endocrinology* **8**, 717–727 (2012).
- [4] Arafah, B. M.: REVIEW: Hypothalamic pituitary Adrenal function during critical illness: Limitations of current assessment methods. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **91**:10, 3725–3745 (2006).
- [5] Ledvina, M.; Stoklasová, A.; Cerman, J.: *Biochemie pro studující medicíny II*. Praha, Karolinum 2009.
- [6] Chan, S.; Debono, M.: Replication of cortisol circadian rhythm: New advances in hydrocortisone replacement therapy. *Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism* **1**:3, 129-138 (2010).
- [7] Kršek, M.; Hána, V.: *Cushingův syndrom*. Praha, Galén 2006.
- [8] Fryšák, Z.: Současný klinický přístup k nádorům nadledvin. *Interní medicína pro praxi* **9**, 407-409 (2001).
- [9] Kittnar, O.: *Lékařská fyziologie*. Praha, Grada Publishing a. s. 2011.
- [10] Stárka, L.: *Endokrinologie*. Praha, Triton 2010
- [11] Neary, N.; Nieman, L.: Adrenal insufficiency-etiology, diagnosis and treatment. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity* **17**:3, 217-223 (2010).
- [12] Husebye, E. S.; Allolio, B.; Arlt, W.; Badenhoop, S.; Bensing, C.; Betterle, C.; Falorni, A.; Gan, E. H.; Hulting, A. –L.; Kasperlik – Zaluska, A.; Kämpe, K.;

- Løvås, K.; Meyer, G.; Pearce, S. H.: Consensus statement on the diagnosis, treatment and follow-up of patients with primary adrenal insufficiency. *Journal of Internal Medicine* **275**, 104–115 (2014).
- [13] Greenspan, F. S.; Baxter, J. D.: *Základní a klinická endokrinologie*. 4. Přepřac. vyd. Praha, H&H Vyšehradská 2003.
- [14] Ten, S.; New, M.; Maclaren, N.: Addison's disease 2001. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **86** :7, 2909-2922 (2001).
- [15] Zima, T.: *Laboratorní diagnostika*. 2. přepřac. vyd. Praha, Galén, Karolinum 2007.
- [16] Erichsen, M. M.; Løvås, K.; Skinningsrud, B.; Wolff, A. B.; Undlien, D. E.; Svartberg, J.; Fougner, K. J.; Berg, T. J.; Bollerslev, J.; Mella, B.; Carlson, J. A.; Erlich, H.; Husebye, E. S.: Clinical, immunological, and genetic features of autoimmune primary adrenal insufficiency: Observations from a Norwegian registry. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **94** :12, 4882–4890 (2009).
- [17] Brunová, J.; Bruna, J.: *Klinická endokrinologie a zobrazovací diagnostika endokrinopatií*. Praha, Maxdorf Jessenisu 2009.
- [18] Sarkar, S. B.; Sarkar, S.; Ghosh, S.; Bandyopadhyay, S.: Addison's disease. *Contemporary Dentistry* **3**:4, 484–486 (2012).
- [19] Arlt, W.: The Approach to the adult with newly diagnosed adrenal insufficiency. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **94**, 1059-1067 (2009).
- [20] Prabhakar, V. K. B.; Shalet, S. M.: Aetiology, diagnosis, and management of hypopituitarism in adult life. *Postgraduate Medical Journal* **82**:996, 259–266 (2006).
- [21] Hána, V.: *Endokrinologie - minimum pro praxi*. Praha, Triton (1998).
- [22] Deutschbein, T.; Unger, N.; Mann, K.; Petersenn, S.: Diagnosis of secondary adrenal insufficiency in patients with hypothalamic-pituitary disease: comparison between serum and salivary cortisol during the high-dose short synacthen test. *European Journal of Endocrinology* **160**:1, 9-16 (2009).

- [23] Hägg, E.; Asplund, K.; Lithner, F.: Value of basal plasma cortisol assays in the assessment of pituitary-adrenal insufficiency. *Clinical Endocrinology* **26**:2, 221-226 (1987).
- [24] Schmidt, I. L.; Lahner, H.; Mann, K.; Petersenn, S: Diagnosis of adrenal insufficiency: Evaluation of the corticotropin-releasing hormone test and basal serum. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **88**:9, 4193–4198 (2003).
- [25] Dickstein, G.; Saiegh, L: Low-dose and high-dose adrenocorticotropin testing: indications and shortcomings. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes & Obesity* **15**, 244–249 (2008).
- [26] Deutschbein, T.; Unger, N.; Mann, K.; Petersenn, S.: Diagnosis of secondary adrenal insufficiency in patients with hypothalamic–pituitary disease: Comparison between serum and salivary cortisol during the high-dose short synacthen test. *European Journal of Endocrinology* **160**, 9–16 (2009).
- [27] Partsch, C. J.; Mönig, H.; Sippel, W. G.: Endokrinologická funkční diagnostika. 5 přepřac. vyd. Praha, Galén 2008.
- [28] Dekkers, O. M.; Timmermans, J. M.; Smit, J. W. A.; Romijn, J. A.; Pereira, A. M.: Comparison of the cortisol responses to testing with two doses of ACTH in patients with suspected adrenal insufficiency. *European Journal of Endocrinology* **164**, 83–87 (2011).
- [29] Koivunen, M. E.; Krogsrud, R. L.: Principles of immunochemical techniques used in clinical laboratories. *Labmedicine* **37**:8, 490-497 (2006).
- [30] Štern, P.: *Obecná a klinická biochemie pro bakalářské obory studia*. 2. přepřac. vyd. Praha, Karolinum 2011.
- [31] Gröschl. M.: Current Status of Salivary Hormone Analysis. *Clinical Chemistry* **54**:11, 1759–1769 (2008).
- [32] Wheeler, M. J.; Hutchinson, J. S. M.: *Hormone assays in biological fluids*. New Jersey, Human press 2006.
- [33] Wu, A. H. B.: A selected history and future of immunoassay development and applications in clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta* **369**:2, 119–124 (2006).
- [34] Wu, J. T.: *Quantitative immunoassay: A practical guide for assay establishment, troubleshooting, and clinical application*. Washington, DC, AACC Press 2000.

- [35] Sharp, P. F.; Gemmel, H. G.; Murray, A. D.; *Practical nuclear medicine*. 3 přeprac. vyd. Londýn, Springer 2005.
- [36] Kaušitz, J.: *Rádioimunoanalýza v onkologii*. Plzeň, LF UK 1991.
- [37] Riad-Fahmy, O.; Read, G. F.; Gaskell, S. J.; Dyas, J.; Hindawi, R.: A Simple, direct radioimmunoassay for plasma cortisol, featuring a  $^{125}\text{I}$  radioligand and a solid-phase separation technique. *Clinical Chemistry* **25**:5, 665-668 (1979).
- [38] Hampl, R.; Stárka, L.: Radioimunologické stanovení steroidních hormonů, souborný referát. *Acta Universitatis Palackianae Olomucensis Facultatis Medicae*, 1976.
- [39] Hampl, R.; Stárka, L.: Recent advances in immunoassay of steroid hormones. *Trends in Analytical Chemistry* **8**:2, 72-75 (1989).
- [40] Wisdom, G. B.: Enzyme-Immunoassay. *Clinical Chemistry* **22**:8, 1243
- [41] Degan, P.; Podestà, A.; Montagnoli, G.: Time-Resolved Fluoroimmunoassay. *Molecular Biotechnology* **13**, 215-222 (1999).
- [42] Mathis, G.: Rare earth cryptates and homogeneous fluoroimmunoassays with human sera. *Clinical Chemistry* **39**:9, 1953-1959 (1983).
- [43] Araújo-Filho, J. L. S.; Mello, M. R.; Carvalho, L. B.: Potential applications of the chemiluminiscent methods in tumoral diseases investigation. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* **2**:2, 392-400 (2011).
- [44] Tighe, P. J.; Ryder, R. R.; Todd, I.; Fairclough, L. C.: ELISA in the multiplex era; potential and pitfalls. *Proteomics - Clinical Applications* 1-33 (2015).
- [45] <<http://www.healthcare.siemens.com/immunoassay/systems/advia-centaurxp>> [cit. 11. 4. 2015]
- [46] <[https://www.berthold.com/en/bio/gamma\\_counter\\_Multi\\_Crystal\\_LB2111](https://www.berthold.com/en/bio/gamma_counter_Multi_Crystal_LB2111)> [cit. 11. 4. 2015]
- [47] <[http://www.stratec.com/en/instrumentation/Off\\_the\\_shelf/SR300/index.php](http://www.stratec.com/en/instrumentation/Off_the_shelf/SR300/index.php)> [cit. 11. 4. 2015]
- [48] <<http://sekk.cz/terminologie/Text/Terminologie.htm>> [cit. 11. 4. 2015]

- [49] <<http://laboratore.vfn.cz/vysetreni/detail.php?pre=1&start=1>> [cit. 11. 4. 2015]
- [50] Abdu, T. A. M.; Elhadd, T. A.; Neary, R.; Clayton, R. N.: Comparison of the Low Dose Short Synacthen Test ( $1\mu\text{g}$ ), the conventional dose short synacthen test ( $250\mu\text{g}$ ), and the insulin tolerance test for assessment of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in patients with pituitary disease. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **84**:3, 838-843 (1999).
- [51] Nye, E. J.; Grice, J. E.; Hockings, G. I.; Strakosch, Ch. R.; Crosbie, G. V.; Walters, M. M.; Jackson, R. V.: Comparison of adrenocorticotropin (ACTH) stimulation tests and insulin hypoglycemia in normal humans: Low dose, standard high dose, and 8-hour ACTH-(1-24) infusion tests. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **84**:10, 3648-3655 (1999).
- [52] M. Kınap, M.; Çolak, R.; Eser, C.; Özsoy, O.; Tutus, A.; Kelestimur, F.: A comparison between low-dose ( $1\mu\text{g}$ ), standard-dose ( $250\mu\text{g}$ ) ACTH stimulation tests and insulin tolerance test in the evaluation of hypothalamo-pituitary-adrenal axis in primary fibromyalgia syndrome. *Clinical Endocrinology* **55**:4, 455-459 (2001).
- [53] Davies, M. J.; Howlett, T. A.: A survey of the current methods used in the UK to assess pituitary function. *Journal of the Royal Society of Medicine* **89**, 159-164 (1996).
- [54] Agwu, J. C.; Spoudeas, H.; Hindmarsh, P. C.; Pringle, P. J.; Brook, C. G. D: Test of adrenal insufficiency. *Archives of Disease in Childhood* **80**, 330-333 (1999).
- [55] Cunningham, S. K.; Moore, A.; McKenna, T. J.: Normal cortisol response to corticotrophin in patients with secondary adrenal failure. *Archives of Internal Medicine* **143**, 2276-2279 (1983).
- [56] Ammari, F.; Issa, B. G.; Millward, E.; Scanlon, M. F.: A comparison between the short ACTH and insulin stress test for assessing hypothalamo-pituitary-adrenal function. *Clinical Endocrinology* **44**, 473-476 (1996).
- [57] Thaler, L. M.; Lewis S. BLEVINS, L. S. jr.: The low dose ( $1\mu\text{g}$ ) adrenocorticotropin stimulation test in the evaluation of patients with suspected central

adrenal insufficiency. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **83**:8, 2726-2729 (1998).

- [58] Islam, N.; Javaid A. Khan, J. A.: Normal short synacthen test in atients with secondary adrenal failure. *Annals of Saudi Medicine* **18**:2, 151–153 (1998).
- [59] M Maghnie, M.; Uga, E.; Temporini, F.; Di Iorgi, N; Secco, A.; Tinelli, C.; Papalia, A.; Casini, MR.; Loche, S.: Evaluation of adrenal function in patients with growth hormone deficiency and hypothalamic–pituitary disorders: Comparison between insulin-induced hypoglycemia, low-dose ACTH, standard ACTH and CRH stimulation tests. *European Journal of Endocrinology* **152**, 735–741 (2005).
- [60] Nieman, L.: Dynamic evaluation of adrenal hypofunction. *Journal of Endocrinological Investigation* **26**:7, 74-82 (2003).
- [61] Magnusson, B.; Ellison, S. L. R.: Treatment of uncorrected measurement bias in uncertainty estimation for chemical measurements. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **390**, 201–213 (2008).
- [62] Štrauch, B.; Jiří Widimský, J.: primární hyperaldosteronizmus – nejčastější forma sekundární endokrinně podmíněné hypertenze. *Interní medicína pro praxi* **7**, 338-340 (2003).
- [63] Kršek, M.: Pacient s adrenokortikální insuficiencí v ordinaci internisty. *Interní Medicína* **13**:4, 163–166 (2011).
- [64] Brien, T. G.: Human Corticosteroid Binding globulin. *Clinical Endocrinology* **14**, 193-212 (1981).
- [65] Solberg, H. E.: The IFCC recommendation on estimation of reference intervals. The RefVal program. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* **42**, 710–714 (2004).
- [66] Hans Pottel, H.; Vrydags, N.; Mahieu, B.; Vandewynckele, E.; Croes, K.; Martens, F.: Establishing age/sex related serum creatinine reference intervals from hospital laboratory data based on different statistical methods. *Clinica Chimica Acta* **396**, 49–55 (2008).
- [67] Dhillon, W. S.; Kong, W. M.; Le Roux, C. W.; Alaghband-Zadeh, J.; Jones, J.; Carter, G.; Mendoza, N.; Meeran, K.; O’Shea, D.: Cortisol-binding globulin is

important in the interpretation of dynamic tests of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *European Journal of Endocrinology* **146**, 231–235 (2002).

- [68] Erturk, E.; Jaffe, C. .; Barkan, A. L.: Evaluation of the integrity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by Insulin hypoglycemia test. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **83**:7, 2350–2354 (1998).



## 7 Seznam příloh

A Verifikační protokol



## SOP-ÚLBD-CL-Endo-20

Stanovení látkové koncentrace kortizolu  
chemiluminiscenční imunoanalýzou (Kortizol)  
( vydání: 2, změna 0 )

### Verifikační protokol

Data jsou naměřena v období září 2014 – únor 2015

Kontrolní materiál Lyphocheck č.šarže: 40290 exp. 30.4.2016

#### Mezilehlá preciznost:

shoda výsledků sady opakovaných měření téhož vzorku.

Z výsledků se počítá:

1. směrodatná odchylka (SD) v jednotkách koncentrace
2. variační koeficient (CV %)

Kortizol	Definováno výrobce		Stanoveno analyzátořem			
(nmol/l)	průměr	SD	průměr	SD	CV %	n
Lyphocheck 40291	71,5	12,85	84,7	7,57	8,9	40
Lyphocheck 40292	488,5	74,7	57,8	45,5	7,9	40
Lyphocheck 40293	875	132	1054	100	9,5	41

Hodnoty variačních koeficientů pro přesnost ve stanovení imunoanalýz v rozmezí 5-10% jsou vyhovující.

#### Externí hodnocení kvality:

Stanovení kortizol je 2x ročně hodnoceno externí kontrolou kvality pořádanou SEKK v České republice a 2x ročně německým RfB (Referencinstitut für Bioanalytik).

V roce 2014 byl pro kortizol získán certifikát v obou českých a německých cyklech.

#### Nejistota měření:

Odhad nejistoty měření lze vyjádřit jako variační koeficient souboru dlouhodobého sledování jedné hladiny analytu.

Pro všechny hladiny kortizolu je standardní nejistota menší než 9,5 %.

#### Závěr:

Metoda je vhodná pro stanovení kortizolu lidském v séru i moči.

Zpracoval : Ing. D. Springer, Ph.D.

Datum : 1.3.2015

Výtisk č. : 1